

UNIVERSIDADE DA CORUÑA

FACULTADE DE CIENCIAS

GRADO EN QUÍMICA

MEMORIA DEL TRABAJO DE FIN DE GRADO

Síntesis y caracterización de biomateriales con aplicación en la  
regeneración de tejidos biológicos

Síntese e caracterización de biomateriais con aplicación na rexeneración de tecidos  
biolóxicos

Synthesis and characterization of biomaterials with applications in regeneration of  
biological tissues

Directores: Manuel Sánchez Andújar y Santiago García Pardo

**Carmen Fernández Aguiño**

Curso 2015/2016 Convocatoria de Junio de 2016



## Agradecimientos:

A mis tutores, Manolo y Santiago, por todo el tiempo invertido y el apoyo recibido durante estos meses.

Al personal del CICA y a QUIMOLMAT, en especial a QUIMOLMAT 1 por haberme ayudado cuando lo he necesitado.

A Developbiosystem, por confiarme material e instrumental, y a todos sus trabajadores que me han ayudado en todo lo posible.

A mis padres, que han sido el pilar fundamental en mi paso por la carrera, sin su apoyo no hubiese llegado hasta aquí. Muchísimas gracias por invertir en mis sueños, confiar en mis posibilidades y no haberos rendido conmigo.

A Miguel, por todos los “tu puedes!”, la comprensión en las épocas de stress, los enhorabuenas en los buenos momentos, los abrazos en los peores momentos y por haberme acompañado en este duro viaje día a día.

A Alberto, Sandra, Manolo, Luís, Teté y la pequeña Lia, por todo el ánimo, los abrazos, las videollamadas cuando asomaba la morriña, los toques de atención y sobre todo porque sin ellos, mi familia, esto tendría menos sentido.

A Lorena, que vio nacer mi pasión por la química, compartió las primeras noches en vela y por todas esas horas y horas al teléfono cuando nuestros caminos se separaron.

Y finalmente a mis 9, porque sin ellas la experiencia hubiese sido mucho menos divertida.





## ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS Y SÍMBOLOS

---

**HA:** hidroxiapatita

**$\beta$ -TCP:** beta-fosfato tricálcico

**CDHA:** hidroxiapatita deficiente en calcio

**BCP:** fosfato cálcico bifásico

**ACP:** fosfato de calcio amorfo

**OCP:** fosfato octacálcico

**DCPD:** fosfato dicálcico dihidratado

**Ca/P:** relación calcio/fósforo

**PCL:** policaprolactona

**PEG:** polietilenglicol

**PLA:** ácido poliláctico

**MPa:** megapascales

**GPa:** gigapascales

**FDA:** Food and Drugs Administration

**EMA:** European Medicines Agency

**NIST:** National Institute of Standards and Technology

**IR:** infrarrojos

**FTIR:** espectroscopía de infrarrojos con transformada de Fourier

**ATR:** reflectancia total atenuada

**SEM:** microscopía electrónica de barrido

**TEM:** microscopía electrónica de transmisión

**EDX:** análisis de energía dispersa de rayos X

**TGA:** análisis termogravimétrico

**%:** tanto por cien

**°:** grados

**Å:** Ångström

**°C:** grado centígrado

**cm:** centímetro

**mm:** milímetro

**nm:** nanómetro

**$\mu$ m:** micrómetro

**g:** gramos

**mg:** miligramos

**L:** litro

**mL:** mililitro

**min:** minuto

**mol:** mol

**g/mol:** gramos/mol

**g/L:** gramos/litro

**mg/mL:** miligramos/mililitro

**mm/min:** milímetros/minuto

**°C/min:** grado centígrado/minuto

**rpm:** revoluciones por minuto

**$\sigma$ :** esfuerzo de compresión

**$\epsilon$ :** deformación

**$l_0$ :** longitud inicial

**$l_f$ :** longitud final

**F:** fuerza



## ÍNDICE

---

<b>1</b>	<b>Resumen – Resumen – Abstract.....</b>	<b>9</b>
1.1	Resumen.....	9
1.2	Resumen.....	10
1.3	Abstract .....	11
<b>2</b>	<b>Introducción .....</b>	<b>13</b>
2.1	Biomateriales .....	14
2.2	Biocerámicas.....	18
2.2.1	Hidroxiapatita .....	19
2.2.2	$\beta$ -fosfato tricálcico .....	22
2.2.3	Fosfato cálcico bifásico .....	24
2.3	Biocomposites .....	26
2.3.1	Biocomposite de BCP y biopolímero .....	27
<b>3</b>	<b>Objetivos .....</b>	<b>31</b>
<b>4</b>	<b>Parte experimental.....</b>	<b>33</b>
4.1	Síntesis de HA, $\beta$ -TCP y BCP mediante vía húmeda .....	33
4.1.1	Reacciones generales.....	33
4.1.2	Reactivos.....	34
4.1.3	Material.....	34
4.1.4	Montaje.....	35
4.1.5	Procedimiento experimental.....	35
4.2	Síntesis de HA y $\beta$ -TCP por método cerámico.....	37
4.2.1	Reacción general .....	37
4.2.2	Reactivos.....	37
4.2.3	Material.....	37
4.2.4	Cálculos.....	37
4.2.5	Procedimiento experimental.....	38
4.3	Funcionalización del BCP con policaprolactona .....	39
4.3.1	Reacción general .....	39
4.3.2	Reactivos.....	39
4.3.3	Material.....	39
4.3.4	Procedimiento experimental.....	40
4.4	Funcionalización del BCP con polietilenglicol .....	41
4.4.1	Reactivos.....	41

4.4.2	Material.....	41
4.4.3	Procedimiento experimental.....	41
<b>5</b>	<b>Instrumental y métodos .....</b>	<b>43</b>
5.1	Caracterización por difracción de rayos X.....	43
5.2	Caracterización por espectroscopía de infrarrojos.....	45
5.3	Caracterización por microscopía electrónica .....	47
5.3.1	Microscopía electrónica de barrido (SEM) .....	48
5.3.2	Microscopía electrónica de transmisión (TEM) .....	50
5.4	Ensayo de compresión.....	52
5.5	Análisis termogravimétrico.....	54
<b>6</b>	<b>Resultados y discusión.....</b>	<b>55</b>
6.1	Caracterización de HA, $\beta$ -TCP y BCP preparados mediante vía húmeda .....	55
6.1.1	Caracterización del precursor CDHA .....	55
6.1.2	Caracterización del BCP .....	57
6.1.3	Caracterización de la HA y el $\beta$ -TCP .....	62
6.2	Caracterización de HA y $\beta$ -TCP preparados mediante vía seca.....	63
6.2.1	Caracterización mediante difracción de rayos X de polvo .....	63
6.2.2	Caracterización mediante espectroscopia de infrarrojos .....	65
6.2.3	Caracterización de la morfología mediante SEM.....	66
6.3	Caracterización del BCP funcionalizado .....	67
6.3.1	Caracterización del recubrimiento con PCL .....	67
6.3.2	Caracterización del recubrimiento con PEG .....	70
6.4	Estudio de propiedades mecánicas del BCP .....	71
<b>7</b>	<b>Conclusiones – Conclusiones- Conclusions .....</b>	<b>75</b>
7.1	Conclusiones .....	75
7.2	Conclusiones .....	76
7.3	Conclusions .....	77
<b>8</b>	<b>Bibliografía .....</b>	<b>79</b>

## 1 RESUMEN – RESUMO – ABSTRACT

---

### 1.1 RESUMEN

---

En este Trabajo de Fin de Grado se ha estudiado la síntesis por vía húmeda de fosfato cálcico bifásico (compuesto por hidroxiapatita y  $\beta$ -fosfato tricálcico) y la síntesis de ambos compuestos puros por vía seca y vía húmeda.

Los resultados obtenidos nos indican que el fosfato cálcico bifásico se puede preparar de manera sencilla y rápida mediante vía húmeda. Por el contrario, la hidroxiapatita y el  $\beta$ -fosfato tricálcico se obtuvieron puros empleando una vía seca.

Para la caracterización morfológica, composicional y estructural de los productos obtenidos se han empleado diferentes técnicas, como por ejemplo de difracción de rayos X de polvo, espectroscopía infrarroja, energía dispersiva de rayos X, microscopía electrónica de barrido y de transmisión, análisis termogravimétrico y también se han realizado ensayos de compresión.

Los resultados indican que el fosfato cálcico bifásico obtenido por vía húmeda se puede emplear para su uso como andamiaje en la regeneración de tejido óseo dado que presenta las características físicas y químicas que lo hacen un buen candidato para éste propósito.

Por otra parte, se ha realizado la preparación de *biocomposites* mediante la funcionalización de la superficie del fosfato cálcico bifásico con policaprolactona o polietilenglicol.

Para la obtención del *biocomposite* con policaprolactona, se ha realizado una reacción de polimerización consiguiendo la formación del polímero, pero este no se ha adherido a la superficie de la cerámica. También se ha preparado un *biocomposite* con polietilenglicol, en este caso se ha preparado una dispersión en agua de polietilenglicol y fosfato cálcico bifásico obteniendo un recubrimiento efectivo del material cerámico.

## 1.2 RESUMO

---

Neste Traballo de Fin de Grao estudouse a síntese por vía húmida de fosfato cálcico bifásico (composto por hidroxiapatita e  $\beta$ -fosfato tricálcico) e a síntese de ambos compostos puros por vía seca e vía húmida.

Os resultados obtidos indican que o fosfato cálcico bifásico pódese preparar de maneira rápida e sinxela mediante vía húmida. Polo contrario, a hidroxiapatita e o  $\beta$ -fosfato tricálcico obtivéronse puros empregando unha vía seca.

Para a caracterización morfolóxica, composicional e estrutural dos produtos obtidos empregáronse diferentes técnicas, como por exemplo de difracción de raios X de pó, espectroscopía infravermella, enerxía dispersiva de raios X, microscopía electrónica de varrido e de transmisión, análise termogravimétrico e tamén se realizaron ensaios de compresión.

Os resultados indican que o fosfato cálcico bifásico obtido por vía húmida pódese empregar para o seu uso como andamiaxe na rexeneración de tecido óseo xa que presenta as características físicas e químicas que o fan un bo candidato para este propósito.

Por outra banda, realizouse a preparación dun *biocomposite* mediante a funcionalización da superficie do fosfato cálcico bifásico con policaprolactona ou polietilenglicol.

Para a obtención do *biocomposite* con policaprolactona realizouse unha reacción de polimerización conseguindo a formación do polímero, pero este non se adheriu á superficie da cerámica. Tamén se preparou un *biocomposite* con polietilenglicol, neste caso preparando unha dispersión en auga do polietilenglicol e o fosfato cálcico bifásico obtendo un recubrimento efectivo do material cerámico.

### 1.3 ABSTRACT

---

In this Final Grade Project, it has studied the synthesis of BCP (consisting of hydroxyapatite and  $\beta$ -tricalcium phosphate) by a wet method and the synthesis of both pure compounds by a wet and a dry method

The obtained results indicate that the biphasic calcium phosphate can be easily and quickly obtained by a wet-method. Unlike, the hydroxyapatite and the  $\beta$ -tricalcium phosphate were obtained by a dry-method.

The morphological, compositional and structural characterization of the obtained compounds have been carried out by different techniques, such as X-ray powder diffraction, infrared spectroscopy, energy dispersive X-ray spectroscopy, scanning and transmission electron microscopy, thermogravimetric analysis and compressive tests.

The results indicate that the obtained biphasic calcium phosphate by the wet-method is suitable as scaffold in bone tissue regeneration, since it shows physical and chemical characteristics that make it a good candidate for this purpose.

On the other hand, a biocomposite had been prepared functionalizing the biphasic calcium phosphate's surface with poly-caprolactone or poly-ethylene glycol.

For the biocomposite with polycaprolactone grafting, the polymer was synthesized by a polymerization reaction, but the polymer has not been grafted to surface of the ceramic. Additionally, it also was prepared a new biocomposite with polyethylene glycol by an aqueous suspension of poly-ethylene glycol and biphasic calcium phosphate, where the grafting of the ceramic material was successfully.





## 2 INTRODUCCIÓN

---

En el presente trabajo de fin de grado se estudiará la síntesis y la caracterización de biomateriales para su aplicación en la regeneración de tejido óseo. Por tanto se estudiará la síntesis y caracterización de cerámicas, en concreto un fosfato cálcico bifásico (de ahora en adelante BCP) compuesto por hidroxiapatita (HA) y fosfato tricálcico en su forma  $\beta$  ( $\beta$ -TCP) y su posterior funcionalización con policaprolactona (PCL) partiendo del monómero  $\epsilon$ -caprolactona y realizando la polimerización por apertura de anillo *in situ* y, por otro lado, se realizará la funcionalización de la superficie de la cerámica con el polímero polietilenglicol 3000 (PEG 3000) de peso molecular promedio 3000g/mol.

El BCP es un biomaterial encuadrado en el grupo de las biocerámicas que sirve como andamiaje o *scaffold* para la regeneración de tejido óseo. Mientras que el BCP funcionalizado con PCL o PEG es un biomaterial encuadrado en la familia de *biocomposites* y sus aplicaciones en el campo de la regeneración ósea se basan en la facilidad con la que este biomaterial puede ser insertado en el hueso en un formato similar a una pasta o cemento.

## 2.1 BIOMATERIALES

La introducción de materiales no-biológicos en el cuerpo humano ha formado parte de la historia durante miles de años. Los restos de un humano encontrados cerca de Kennewik, Washington, USA, los cuales se han datado con 9000 años de antigüedad señalan que este individuo, descrito por los arqueólogos como una persona sana y activa, tenía una punta de lanza clavada en su cadera. La herida había curado y, aparentemente, no impidió sus actividades diarias. Este implante fortuito ilustra a la perfección la capacidad del cuerpo humano de afrontar la presencia de materiales externos a él. Otro ejemplo de introducción de materiales extraños la encontramos en los pueblos Mayas en el 600 a.C, que utilizaban nácar extraído de las conchas marinas para sustituir dientes y con las que consiguieron lo que se conoce ahora como osteointegración, que es básicamente una integración del nácar con el hueso. Y como éstos muchos otros (Tabla 1) han usado biomateriales a lo largo de la historia.<sup>1 2</sup>

Tabla 1 Avances significativos en la historia de los biomateriales<sup>2</sup>

Year	Individual(s)	Development
Prehistoric		Various sutures, metal wires, pins
1860s	J. Lister	Aseptic surgical technique
1886	C. Hansmann	Plates, screws for fracture fixation
1887	Adolf Fick	Glass contact lens
1912	W. D. Sherman	Vanadium steel plates and screws
1930–31	A. S. Hayman, M. C. Lidwill	Portable pacemaker
1936–37	A. E. Strock	Vitallium for dental implants
1938	Philip Wiles	Total hip replacement
1949	Sir Harold Ridley	Intraocular lens
1951	G. K. McKee, J. Watson-Farrar	Biomechanically successful total hip design
1952	Ingvar Branemark	Osteointegration of metal implants
1952	A. B. Voorhees	Prosthetic vascular graft
1958	Earl E. Bakken	Wearable pacemaker
1959	Sir John Charnley	Use of polymer in total joints
1960	L. Edwards, A. Starr	Mitral valve replacement
1981	W. Kolff and others	Implantable artificial heart
1980s	Julio Palmaz	Balloon expandable stent

Pero no es hasta hace 70 años cuando se consolida el campo de los biomateriales, el cual tiene un impacto significativo en la salud humana, la economía y en el ámbito científico. Los biomateriales y los dispositivos médicos hechos a base de ellos son comúnmente usados como prótesis en cirugía cardiovascular, ortopédica, dental, oftalmológica y reconstructiva y en otras intervenciones tales como las suturas quirúrgicas, los bioadhesivos y los dispositivos de liberación de fármacos. Como consecuencia, se han salvado millones de vidas humanas y se le ha mejorado la calidad de vida a otras tantas.<sup>3</sup>

El campo de los biomateriales ha experimentado un crecimiento acelerado desde que los primeros dispositivos fueron aceptados para el uso en humanos a finales de la década de 1940 y principios de la década de 1950.

La investigación y desarrollo en biomateriales ha sido estimulada y guiada por los avances en biología celular y molecular, química, ciencia de los materiales y la ingeniería. La comunidad de biomateriales ha sido el mayor contribuyente para la comprensión de las interacciones de los materiales con el medio fisiológico. El desarrollo de biomateriales para las aplicaciones médicas y dentales ha evolucionado a través de tres generaciones, cada una un poco solapada con la anterior, pero con objetivos distintos (Figura 1).<sup>3</sup>

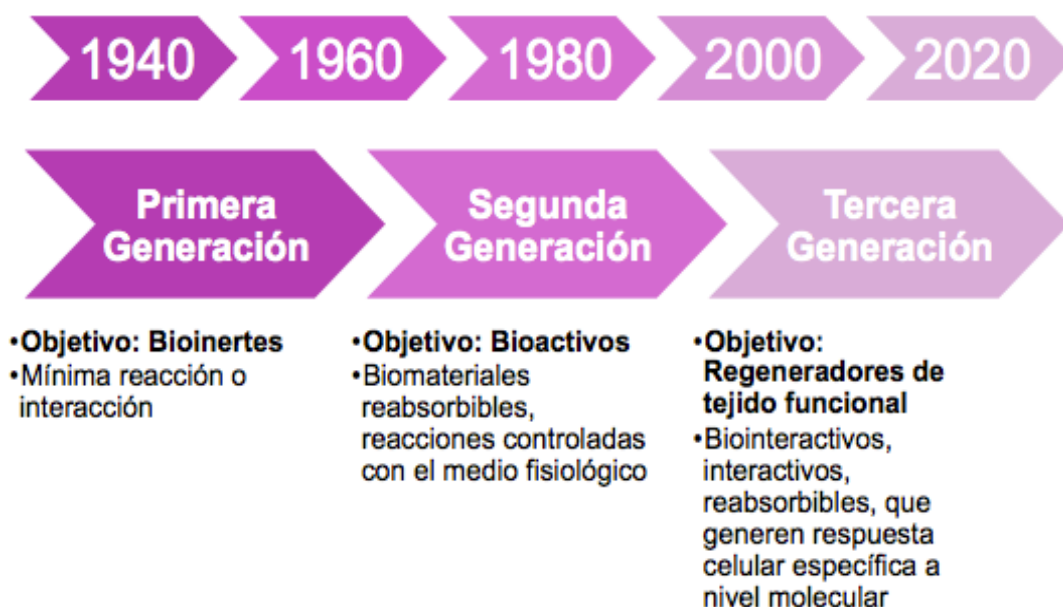


Figura 1 Evolución de los biomateriales, ciencia y tecnología<sup>3</sup>

En la primera generación, los biomateriales eran bioinertes, es decir, que no daban lugar a reacción, ni favorable ni desfavorable, con los tejidos o células vivas cuando interacciona con ellos, habitualmente mediante contacto directo. Los biomateriales de segunda generación son bioactivos, es decir, que provocan una reacción controlada con los tejidos en los que se implantan con el fin de inducir un efecto terapéutico. Finalmente, los biomateriales de tercera generación son biointeractivos, esto quiere decir que tienen la capacidad de apoyar y estimular la regeneración de tejido funcional.<sup>3</sup>

Al igual que los biomateriales han evolucionado con el tiempo, su definición también ha evolucionado, y desde el año 1991 la Sociedad Europea de Biomateriales decidió definir los biomateriales como aquellos “materiales utilizados para evaluar, curar, corregir o reemplazar cualquier tejido, órgano o función del cuerpo humano”<sup>4</sup>

Con el fin de evaluar el rendimiento de un biomaterial o implante en su uso en el cuerpo humano es necesario revisar la fisiología, anatomía, bioquímica y biomecánica de los tejidos normales así como los cambios patofisiológicos que requiere la intervención para restaurar su función normal, ya que la mayoría de los implantes requieren intervenciones quirúrgicas para su instalación.<sup>1</sup>

En la Figura 2 se representan de forma esquemática los factores que afectan al éxito en las intervenciones en las que se emplean biomateriales:



Figura 2 Características óptimas de los biomateriales<sup>1</sup>

En cuanto a su clasificación, existen cuatro grandes familias de biomateriales de los cuales se detallan varios ejemplos a continuación:

- **Metálicos:** titanio y sus aleaciones, acero inoxidable...
- **Cerámicos:** hidroxiapatita, alúmina, vidrios bioactivos...
- **Poliméricos:** ácido poliláctico (PLA), policaprolactona (PCL)...
- **Composites:** empastes (cerámicas + polímero), cementos reforzados...

Independientemente de la clasificación anterior, los biomateriales pueden ser de origen natural (ácido hialurónico, quitosano...) o de origen sintético (aleaciones de titano, PLA, PEG, siliconas...).

Los biomateriales naturales presentan ventajas frente a los biomateriales sintéticos incluyendo la biodegradabilidad, la biocompatibilidad y propiedades físicas, químicas y mecánicas únicas. Además, presentan la porosidad adecuada para facilitar la adherencia y proliferación celular. Sin embargo, también requieren técnicas de purificación tediosas y están sujetos a la posible variación de su procesado, la contaminación y a posibles respuestas inmunogénicas.<sup>5</sup>

En cambio, los biomateriales sintéticos presentan las ventajas propias de cualquier material sintético, como poder ser conformados según las aplicaciones requeridas, su mayor disponibilidad y la capacidad de modificarlos según las necesidades puntuales.<sup>4 6</sup>



Figura 3 Ejemplos de biomateriales sintéticos<sup>3 6</sup>

## 2.2 BIOCERÁMICAS

Las biocerámicas basadas en fosfato de calcio tienen una importancia significativa ya que se encuentran tanto en los tejidos humanos normales (huesos y piezas dentales) como en los tejidos calcificados que aparecen debido a ciertas patologías. Por esa razón, debido a su similitud química con los tejidos óseos, la mayoría de los fosfatos de calcio sintéticos presentan biocompatibilidad y bioactividad.<sup>7</sup>

De las diferentes biocerámicas basadas en fosfato de calcio, la hidroxiapatita sintética y el  $\beta$ -fosfato tricálcico son los materiales cerámicos comúnmente empleados para la realización de andamiajes tanto en la reparación como en la sustitución de tejido óseo dañado.<sup>8</sup>

En la Figura 4 se muestra un ejemplo de andamiaje o *scaffold* y su posterior integración como implante en el tejido óseo dañado.<sup>9</sup>

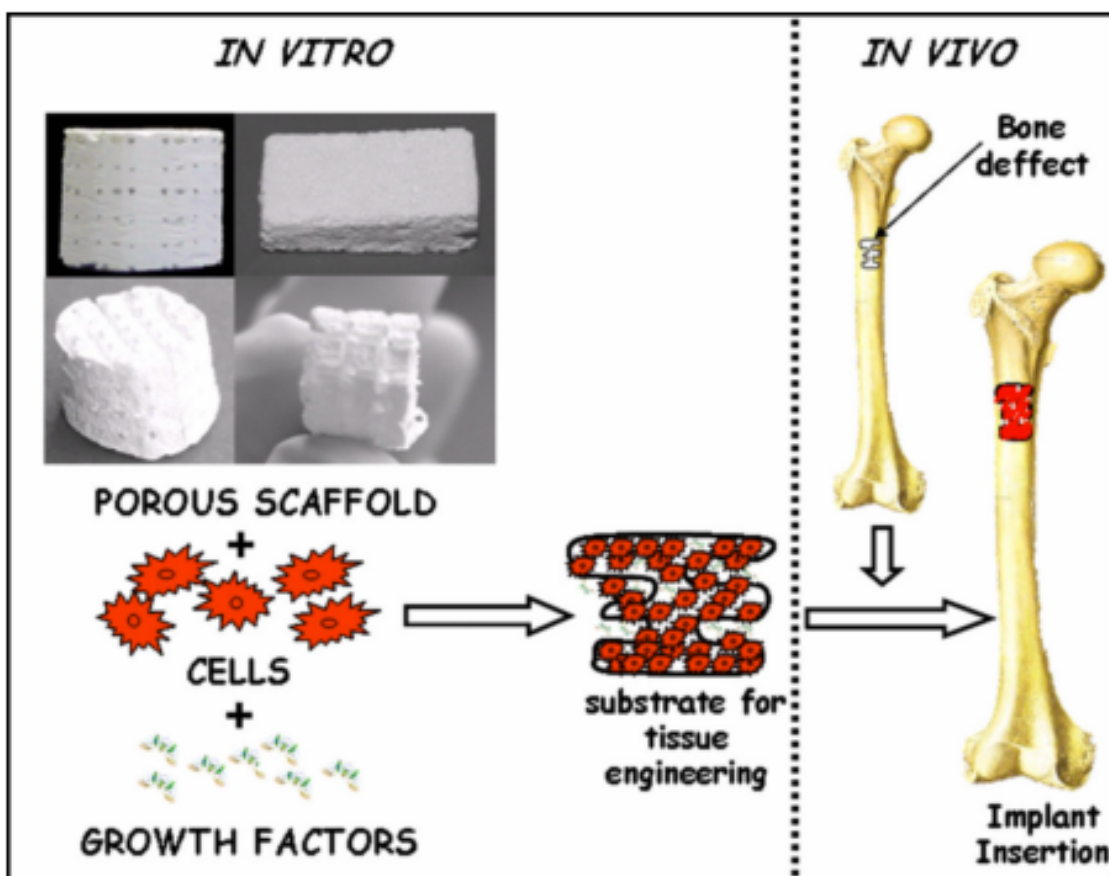


Figura 4 Esquema donde se representa el uso de biocerámicas como andamios en la reparación de tejido óseo<sup>9</sup>

### 2.2.1 Hidroxiapatita

Se entiende por hidroxiapatita (HA) un fosfato de calcio con fórmula  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  (o  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$  al poseer dos unidades fórmula por celda unidad) y con una relación Ca/P de 1.67. La HA sintética es muy empleada en ingeniería de tejidos debido a su similitud química y estructural con la HA natural que se encuentra en los huesos y dientes.<sup>10 11</sup>

En este contexto, la HA natural es deficiente en calcio (la relación Ca/P es ligeramente inferior a 1.67) y presenta diferentes sustituciones químicas en su estructura cristalina, por lo que se puede escribir la siguiente fórmula para describir la HA natural:  $(\text{Ca},\text{M})_{10}(\text{PO}_4,\text{Y})_6(\text{OH},\text{B})_2$  donde M representa la sustitución del  $\text{Ca}^{2+}$  por otros cationes similares como por ejemplo:  $\text{Mg}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ , etc, Y representa la sustitución del anión fosfato por otros aniones similares como por ejemplo  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ , etc y B representa la sustitución del anion  $\text{OH}^-$  por otros aniones similares  $\text{B}=\text{F}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ , etc.<sup>12</sup>

Aunque la HA sintética difiere en cuanto a cristalinidad, estequiometría, composición, propiedades físicas y propiedades mecánicas de la hidroxiapatita natural, ha demostrado ser biológicamente equivalente dado que induce a la misma respuesta celular que la hidroxiapatita natural.<sup>13</sup> Por tanto, la HA sintética se trata de un material sintético biocompatible, osteoconductor y bioactivo, ya que puede formar uniones químicas fuertes y permite la formación de hueso nuevo.

En cuanto a su estructura (Figura 5) la HA tiene estructura hexagonal con un grupo espacial  $\text{P6}_3/\text{m}$  y sus parámetros de celda unidad son  $a=b=9.432 \text{ \AA}$   $c=6.88 \text{ \AA}$ .<sup>14 15</sup>

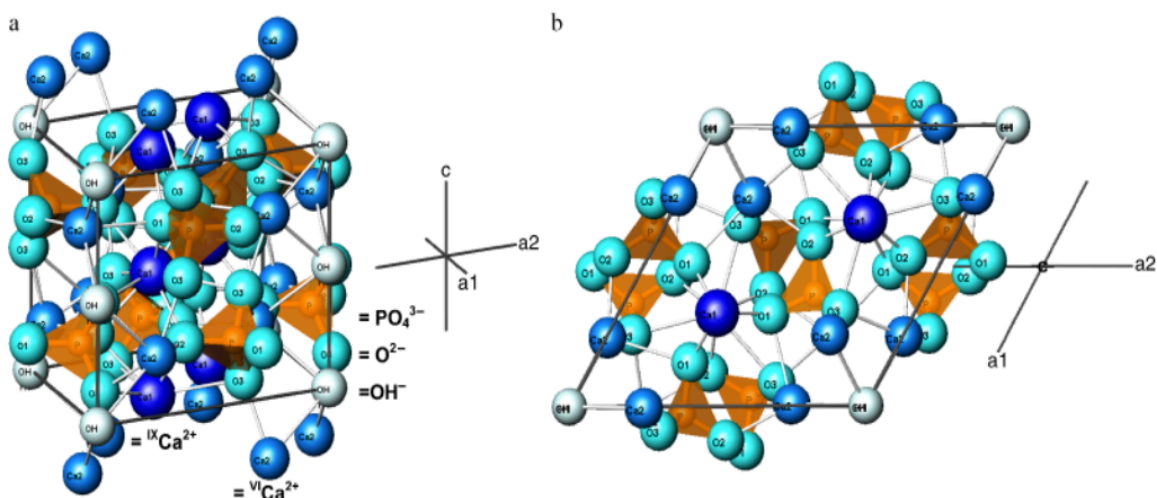


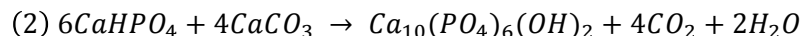
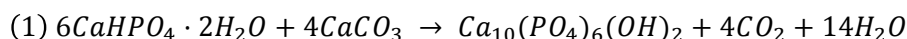
Figura 5 Estructura cristalina de la hidroxiapatita<sup>15</sup>



En relación a sus propiedades químicas, hay que indicar la baja solubilidad de la hidroxiapatita en contacto con los fluidos fisiológicos, y en cuanto a sus propiedades mecánicas, tiene un módulo de Young que se encuentra entre 80 y 110 GPa y una resistencia a la compresión de entre 400 y 900 MPa,<sup>12</sup> la cual es muy superior, por ejemplo al cemento portland que presenta una resistencia a la compresión de 14-21GPa.<sup>17 18</sup>

La HA sintética se puede preparar utilizando diferentes métodos de síntesis, estos se pueden dividir en dos grandes métodos: método de **vía seca o síntesis cerámica** (reacción en estado sólido) y en métodos de **vía húmeda**.<sup>19</sup>

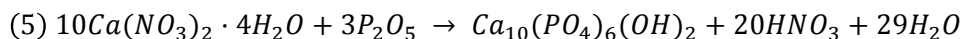
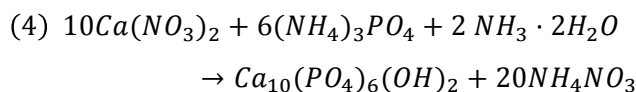
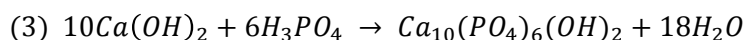
En la síntesis mediante **vía seca o síntesis cerámica** (reacción en estado sólido), la HA se sintetiza empleando reactivos de partida que contengan cationes  $\text{Ca}^{2+}$  y aniones  $\text{PO}_4^{3-}$  y realizando un tratamiento térmico entre 800°C-1200°C. Por ejemplo, se puede preparar HA sintética empleando como reactivos de partida  $\text{CaCO}_3$  y  $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (o su forma anhidra  $\text{CaHPO}_4$ ) de acuerdo con las siguientes reacciones:



Aunque, el método de vía seca permite obtener de una manera sencilla y rápida el material, los métodos de vía húmeda son los empleados habitualmente, ya que permiten controlar, por ejemplo, el tamaño de partícula y la porosidad del producto final, aspectos que son importantes en la bioactividad del material.

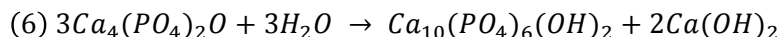
Dentro de los métodos de **vía húmeda** existen diferentes rutas para la preparación de HA sintética, los más importantes son los siguientes:

- **Precipitación.** métodos de vía húmeda que están basados en reacciones de precipitación que dan lugar a la formación de HA como producto final, por ejemplo:

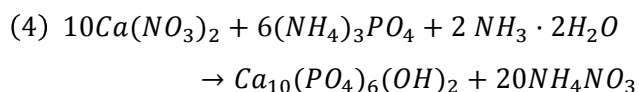




- **Hidrólisis.** Esta vía se basa en la hidrólisis de distintas sales de fosfato de calcio, como por ejemplo el fosfato tetracálcico  $\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$  que es el único fosfato de calcio más básico que la HA



- **Síntesis hidrotermal.** Esta síntesis una disolución acuosa es calentada en un recipiente cerrado a temperaturas superiores a la temperatura de ebullición del agua, lo cual genera una presión en el interior del recipiente que favorece la formación del producto deseado. Los precursores de la formación de HA pueden ser  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  y  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  siguiendo la misma reacción que la del apartado precipitación. En este caso las reacciones se llevan a cabo a temperaturas de 350-400°C en presencia de agua y a un pH de 7.3, para lo cual es necesario un autoclave.



Generalmente, los precipitados obtenidos mediante los métodos de vía húmeda presentan una baja cristalinidad y son no estequiométricos. Por lo tanto, para obtener la HA es necesario realizar un tratamiento térmico de los precipitados, habitualmente a temperaturas inferiores de 1000°C.

### 2.2.2 $\beta$ -fosfato tricálcico

El fosfato tricálcico (TCP, de sus siglas en inglés *tricalcium phosphate*) es un fosfato de calcio con fórmula  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  y una relación Ca/P de 1.50.<sup>10</sup>

Desde el punto de vista estructural, el TCP presenta tres polimorfos:<sup>10 12</sup>

- El  **$\beta$ -TCP** es estable hasta 1120-1170°C
- El  **$\alpha$ -TCP** se obtiene por transformación del  $\beta$ -TCP cuando se alcanza una temperatura mayor a 1120-1170°C.
- El **super- $\alpha$ -TCP** que sólo es estable a temperaturas superiores a los 1430°C e imposible de estabilizar a temperatura ambiente.

Entre las distintas formas alotrópicas del TCP, el  $\beta$ -TCP se prefiere como biocerámica debido a su estabilidad química, resistencia mecánica, y su alta tasa de reabsorción.<sup>20</sup> La mayor solubilidad del  $\beta$ -TCP, frente a la HA, puede ser beneficiosa en algunas aplicaciones ya que las investigaciones hechas a los recubrimientos de fosfato de calcio sugieren que la presencia de iones de calcio y de fosfato liberados durante la disolución cerca de un implante pueden ser más conductores de la formación de hueso que la ausencia de dichos iones.<sup>20</sup>

En cuanto a su estructura, el  $\beta$ -TCP tiene estructura romboédrica con un grupo espacial  $R\bar{3}c$  y los parámetros de la celda unidad son  $a=10.439 \text{ \AA}$  y  $c=37.375 \text{ \AA}$  con 21 unidades fórmula por cada celda unidad hexagonal.<sup>12</sup>

En la siguiente figura se representa la proyección de la estructura cristalina de  $\beta$ -TCP a lo largo de los principales ejes (Figura 6). La estructura cristalina se puede visualizar mediante el apilamiento de dos tipos de columnas: la columna A y la columna B. En la columna A, se alternan grupos  $\text{CaO}_n$  ( $n= 3$  y  $6$ ) y  $\text{PO}_4^{3-}$ , mientras que en la columna B se alternan grupos  $\text{CaO}_n$  ( $n= 7$  y  $8$ ) y  $\text{PO}_4^{3-}$ .<sup>21</sup>



### 2.2.3 Fosfato cálcico bifásico

Los ensayos clínicos han demostrado que la biocerámica más adecuada para la regeneración ósea, es una biocerámica conocida como fosfato cálcico bifásico (BCP), que contiene una mezcla de HA y  $\beta$ -TCP.<sup>23</sup> El BCP es un material que combina las propiedades de estos dos compuestos. En este contexto, el  $\beta$ -TCP presenta unas velocidades de solubilidad mucho mayores en el organismo que la HA. Esta velocidad de reabsorción coincide con la velocidad a la que se forma hueso nuevo, la cual es fundamental para conseguir que el hueso nuevo se forme adecuadamente. Mientras que la HA es menos soluble en el medio fisiológico, proporcionando un soporte mecánico duradero que permite al hueso nuevo crecer sin problemas.

Por tanto, el BCP es un sustituto óseo ideal que permite la formación de hueso nuevo sin degradarse muy rápido o quedándose alojado en el cuerpo humano demasiado tiempo.

Hasta hace poco, el BCP se obtenía accidentalmente durante la preparación de HA o  $\beta$ -TCP. Actualmente, hay descritas diferentes estrategias para preparar esta cerámica mediante vía seca o húmeda, siendo esta última la más habitual, ya que permite un mejor control de las características microestructurales (tamaño de partícula, porosidad, etc) del material y sobre todo permite que las dos fases HA y  $\beta$ -TCP estén homogénea e íntimamente “mezcladas” a un nivel inferior a la micra ( $<1\mu\text{m}$ ) y por tanto que estén íntimamente integradas la una con la otra.<sup>7</sup>

Durante el proceso de preparación del BCP mediante vía húmeda se obtiene un precursor, la hidroxiapatita deficiente en calcio (CDHA) la cual tiene una proporción Ca/P mayor de 1.5 y menor a 1.67.<sup>8</sup> La CDHA se somete posteriormente a un tratamiento térmico en el que parte de la cerámica se convierte en HA y otra parte en  $\beta$ -TCP (Figura 7).<sup>22</sup>

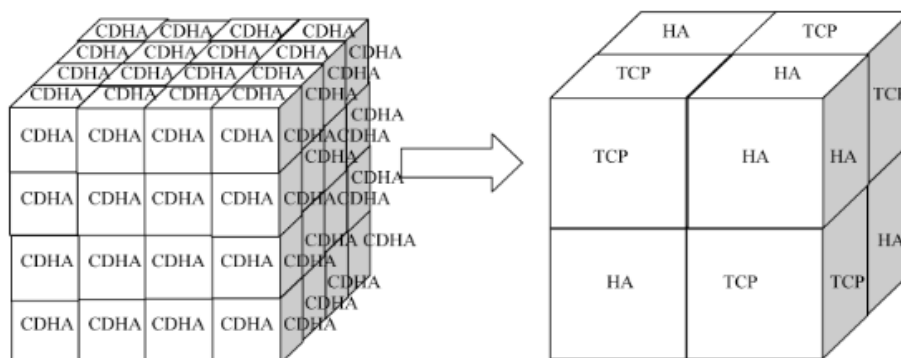
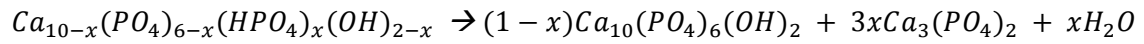


Figura 7 Mecanismo de transformación de CDHA en BCP<sup>22</sup>



Hay dos rutas principales para obtener CDHA mediante métodos de **vía húmeda**:

- **Hidrólisis**, dónde se suelen emplear como reactivos de partida el fosfato de calcio amorfo (ACP), fosfato octacálcico (OCP) y el fosfato dicálcico dihidratado (DCPD)
- **Metodos de precipitación**: se necesita una fuente de calcio, como por ejemplo el acetato de calcio, el hidróxido de calcio o el nitrato de calcio y una fuente de fósforo como el diamonio fosfato de hidrógeno, dihidrógeno fosfato de amonio, ácido fosfórico o una mezcla de hidrógenofosfato dipotásico/dihidrógeno fosfato de potasio.

Cabe destacar que el BCP podría encuadrarse en el apartado de *biocomposites* (descrito más adelante) ya que éste presenta dos fases de naturaleza cerámica. El hecho de que se haya clasificado como un material cerámico bifásico es debido a que las fases de la HA y el  $\beta$ -TCP están homogénea e íntimamente “mezcladas” a un nivel submicrónico ( $<1\mu m$ ) y están íntimamente integradas la una con la otra.<sup>7</sup>

## 2.3 BIOCOMPOSITES

---

Hasta hace poco, la mayoría de los biomateriales estaban constituidos por una sola fase, homogénea e isotrópica tal como los polímeros, los metales y las cerámicas. Por ejemplo, los polímeros son empleados en diferentes aplicaciones médicas debido a su amplia variedad de composiciones, propiedades y formas y que pueden ser conformados rápidamente en complejas formas como fibras, láminas delgadas y geles. Sin embargo, la aplicación de polímeros soportando cargas no es eficiente ya que en general son demasiado elásticos y dúctiles para satisfacer las exigencias mecánicas para ciertas aplicaciones tales como en la cirugía ortopédica.<sup>24</sup> Por otra parte, los metales y cerámicas también son muy empleados como biomateriales sobre todo por su resistencia mecánica. Sin embargo, éstos también presentan limitaciones, los metales son muy pesados y las cerámicas son frágiles, por lo que para determinadas aplicaciones donde se requiere un material ligero y resistente es necesario combinar materiales. En este contexto, la mayoría de los tejidos vivos, como por ejemplo el hueso formado de HA y colágeno, son esencialmente *composites*.<sup>24</sup>

Los *composites* o materiales compuestos son materiales que contienen dos o más fases constituyentes distintas, en una escala más grande que la escala atómica. Los constituyentes conservan su identidad en el *composite*, donde los constituyentes del *composite* no se mezclan o se disuelven completamente entre ellos. Normalmente los componentes que constituyen el *composite* pueden ser identificados físicamente y presentar una interfase entre ellos. En los *composites*, las propiedades tales como el módulo elástico pueden ser significativamente diferentes de las de sus constituyentes por separado.<sup>24</sup> <sup>2</sup> El término *biocomposite* se refiere especialmente a aquellos *composites* que pueden ser empleados en bioingeniería.

### 2.3.1 Biocomposite de BCP y biopolímero

Otro de los métodos empleados para la regeneración ósea, además de la utilización de *scaffolds*, es el empleo de *composites* inyectables (Figura 8) con partículas de BCP recubiertas con un polímero biodegradable .<sup>25 26</sup>



Figura 8 Ejemplo de métodos de aplicación de biocomposites<sup>25 26</sup>

Recubriendo el fosfato cálcico bifásico con policaprolactona (PCL) o polietilenglicol (PEG) obtenemos un *biocomposite* con las propiedades físicas deseadas para un biomaterial empleado en el campo de la regeneración de tejido óseo:<sup>27</sup>

- **Biocompatibilidad:** tanto la HA, el  $\beta$ -TCP , la PCL y el PEG son biocompatibles y por tanto no generarían, en principio, rechazo en el cuerpo humano.
- **Osteoconductividad:** el  $\beta$ -TCP tiene una constante de solubilidad relativamente alta y, los iones de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{PO}_4^{3-}$  favorecen la formación de hueso nuevo.
- **Biodegradabilidad:** en este caso, el  $\beta$ -TCP, la PCL y el PEG son los elementos del biocomposite que cumplirían con la condición ya que la HA es un material más estable en el medio fisiológico (aunque también es soluble en él).
- **Porosidad adecuada:** debido a la biodegradabilidad del  $\beta$ -TCP al disolverse en el medio fisiológico deja caminos por los que pueden crecer de nuevo las células del hueso.
- **Biofuncionalidad:** al ser la HA la cerámica más parecida en cuanto a estructura química a la parte inorgánica del hueso, ésta sería la parte constituyente del composite que le brinda esta característica.
- **Integridad mecánica:** la escasa disolución de la HA junto con la resistencia a la rotura de la PCL y PEG ayudan a que el material pueda soportar las condiciones físicas a las que se somete un hueso en un uso cotidiano.

A continuación se definirá brevemente el material polimérico empleado en este trabajo de Fin de Grado para tener una visión más global éste.

### 2.3.1.1 Biopolímeros

En general, los polímeros son macromoléculas formadas por la unión de moléculas sencillas (llamadas monómeros) mediante enlaces covalentes. Por lo general los polímeros son compuestos basados en el carbono, el hidrógeno, el oxígeno y otros elementos no metálicos.<sup>2</sup>

En el empleo de biopolímeros (y de cualquier biomaterial en general) hay que tener en cuenta que éste esté aprobado por la Food and Drugs Administration (FDA) y la European Medicines Agency (EMA) que son las sociedades encargadas de proteger la salud pública mediante la regulación de los medicamentos de uso humano y veterinario, vacunas y otros productos biológicos y dispositivos médicos tanto en América como en Europa, respectivamente.<sup>28 29 30</sup>

Aunque existen muchas maneras de clasificar a los biopolímeros, en el caso concreto de este Trabajo de Fin de Grado, podríamos clasificarlos en dos grandes grupos: biodegradables y no biodegradables.<sup>31</sup>

En nuestro caso se emplea la policaprolactona (PCL) y el polietilenglicol (PEG 3000), que son polímeros biocompatibles y biodegradables con aplicaciones potenciales en la ingeniería de tejidos, tanto para la reparación de tejido óseo dañado como para la reparación de tejido cartilaginoso. A diferencia de otros polímeros empleados en ingeniería de tejidos, tanto la PCL como el PEG son mucho más estables a temperatura ambiente, baratos y están disponibles en cantidades mayores.<sup>30 32</sup>

La PCL es un poliéster alifático, se obtiene mediante la polimerización por apertura del anillo de  $\epsilon$ -caprolactona usando catalizadores organometálicos homogéneos tales como alcóxido de zinc, aluminio trifluorometanosulfonato, y alcóxidos de estaño. El catalizador estaño(II) 2-etilhexanoato, también se conoce comúnmente como octanoato de estaño ( $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ ) y es el catalizador más popular debido a su bajo coste, su baja toxicidad y alta eficiencia y el único aprobado por la FDA.<sup>31</sup>

En cuanto a sus propiedades físicas, la PCL es un polímero duro, flexible, y semicristalino con un grado de cristalinidad de aproximadamente el 50%. Tiene una temperatura de transición vítrea aproximadamente de  $-60^\circ\text{C}$  y una temperatura de



fusión en torno a 59-64°C.<sup>11</sup> Debido a su baja temperatura de fusión, la PCL es difícil de procesar. Sin embargo, su capacidad de aumentar la movilidad en las cadenas poliméricas hace que sea un candidato adecuado como plastificante. Su biocompatibilidad y su degradación *in vivo* (mucho más lenta que en otros poliésteres), también permiten su uso en el campo médico en los sistemas empleados durante largos períodos de tiempo (1-2 años). Ésta baja tasa de degradación se debe a su relativamente alta cristalinidad e hidrofobicidad.<sup>2 31</sup>

El polietilenglicol (PEG) es un polímero de óxido de etileno, sólido o líquido (líquido si el peso molecular es menor de 200 g/mol y sólido si el peso molecular es mayor de 2000g/mol), con bajo punto de fusión en función de sus pesos moleculares. Los PEG se preparan mediante la interacción de de óxido de etileno con etilenglicol u oligómeros de etilenglicol. La reacción es catalizada por una catálisis ácida o básica. La longitud de la cadena polimérica depende del ratio de los reactivos.<sup>33</sup> En el caso de este Trabajo de Fin de Grado se emplea el PEG 3000, el cual recibe su nombre debido al su peso molecular promedio de 3000g/mol.



### 3 OBJETIVOS

---

Los objetivos de este Trabajo de Fin de Grado se centran en la síntesis y caracterización de biomateriales para su posterior aplicación en la regeneración de tejidos biológicos.

Con este fin se han abordado los siguientes aspectos:

- Búsqueda bibliográfica sobre biomateriales, en concreto sobre biocerámicas y biocomposites.
- Síntesis de biocerámicas de hidroxiapatita,  $\beta$ -fosfato tricálcico y fosfato cálcico bifásico compuesto por las dos anteriores.
- Funcionalización de la superficie de la biocerámica con policaprolactona preparada *in situ* mediante una reacción de polimerización o polietilenglicol para la obtención de un biocomposite.
- Caracterización morfológica y estructural de las biocerámicas y del biocomposite obtenido mediante difracción de rayos X, espectroscopía infrarroja, microscopía electrónica de barrido y de transmisión, análisis de energía dispersa de rayos X y análisis termogravimétrico.
- Estudio de las propiedades mecánicas del fosfato cálcico bifásico mediante ensayos de compresión.



## 4 PARTE EXPERIMENTAL

### 4.1 SÍNTESIS DE HA, $\beta$ -TCP Y BCP MEDIANTE VÍA HÚMEDA

Como se ha comentado en la sección de introducción se han descrito diferentes métodos para la preparación de biocerámicas basadas en fosfato de cálcico HA,  $\beta$ -TCP y BCP (mezcla de los dos anteriores), en este caso se ha escogido el método de síntesis por vía húmeda empleado por Dorozkin y colaboradores<sup>22</sup> ya que es un método sencillo y relativamente rápido de sintetizar BCP.

#### 4.1.1 Reacciones generales

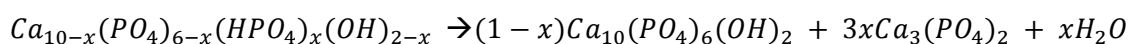
Este método de síntesis consta de dos etapas:

- 1ª Etapa: preparación en disolución del precursor la hidroxiapatita deficiente en calcio (CDHA) mediante la reacción que se indica a continuación:



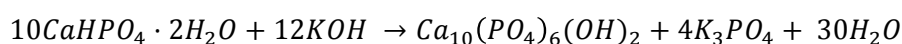
Siendo x un valor comprendido entre 0 y 1 y que indica la cantidad de  $\beta$ -TCP que se formará al someter el CDHA a un tratamiento térmico<sup>22</sup>, por tanto, en función del KOH y del DCPD añadido se puede controlar las proporciones de HA y  $\beta$ -TCP del producto final.

- 2ª Etapa: descomposición térmica del CDHA a alta temperatura para la formación del compuesto o compuestos deseados.

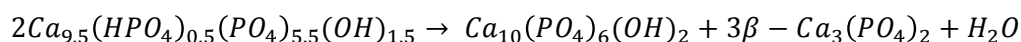


En este trabajo realizarán tres síntesis:

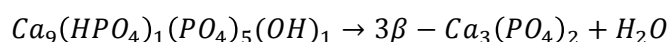
$\Rightarrow$  X=0 preparación de HA pura



⇒ X=0.5 preparación de BCP con 50% de HA y 50 % de β-TCP



⇒ X=1 preparación de β-TCP puro



#### 4.1.2 Reactivos

- DCPD Sigma-Aldrich 98-102.5%
- KOH Vorquímica S.L. 85.20%

#### 4.1.3 Material

- Frasco lavador de gases y gomas
- Rosca grande con goma
- Cabezal de frasco lavador de gases
- Matraz de fondo redondo de 250 mL
- Barra magnética
- Soporte de aluminio para matraz de 250 mL
- Placa calefactora IKA RTC Basic con sonda
- Burbujeador (Bubbler) con silicona líquida
- Vaso de precipitados de 250 mL
- Vidrio de reloj
- Espátula
- Tapón con esmerilado para matraz de boca ancha
- Crisol
- Tubos de centrifuga
- Mortero de ágata
- Centrífuga Hettich Rotina 35
- Horno mufla Lenton LTF 15/50/180

#### 4.1.4 Montaje

La reacción se ha realizado calentando y agitando en atmósfera continua de  $N_2$ , la Figura 9 recoge el montaje de la reacción del apartado 4.1.1

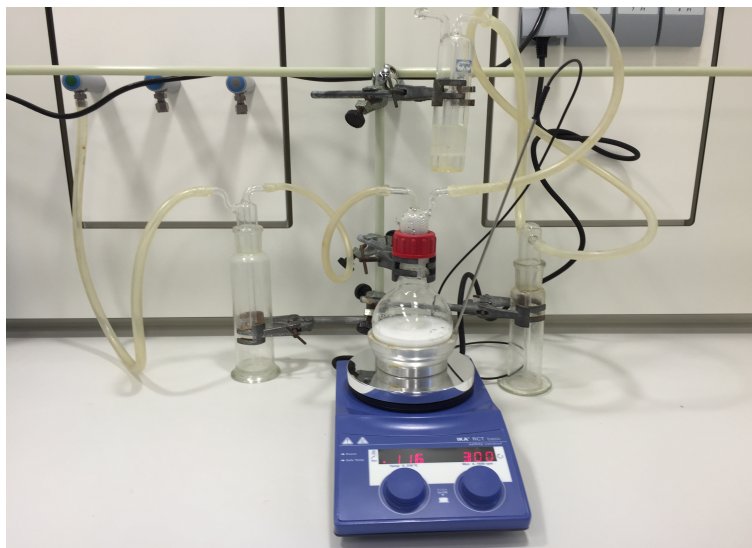


Figura 9 Montaje para la síntesis de BCP

#### 4.1.5 Procedimiento experimental

Partiendo siempre de DCPD ( $100\text{g/L}$ )<sup>22</sup> ya que en la bibliografía partían de suspensiones con estas características pero con las cantidades 10 veces más grandes se han realizado las síntesis recogidas en la Tabla 2.

Tabla 2 Cantidades de reactivos añadidas en cada síntesis de BCP, HA y  $\beta$ -TCP

Síntesis	DCPD (g)	KOH (g)
BCP (50% HA)	10.006	3.605
100% HA	10.004	4.572
100% $\beta$ -TCP	10.032	3.082

Se pesan 10 g de DCPD y se añaden a un matraz de fondo redondo de 250 mL provisto de 100 mL de agua destilada y una barra magnética. Se activa la agitación y el flujo de  $N_2$  durante 10 minutos.

Pasados los 10 minutos, en papel de pesar, se pesa la cantidad estequiométrica de KOH y se añade a la suspensión de agua destilada y DCPD. Se tapa el montaje de nuevo y se conecta la calefacción, con soporte de aluminio y sonda a 115°C

Cuando la disolución comienza a hervir, se deja durante 4 horas con el flujo de nitrógeno constante pasando a través de la disolución y la agitación magnética conectada a 300 rpm.

Pasadas las 4 horas se retira la calefacción y se deja enfriando la disolución hasta que se pueda manejar.

Una vez fría la disolución, se introduce en tubos de centrifuga, se tapa con parafilm y se centrifuga a 5000 rpm durante 3 minutos. Se retira el sobrenadante y se lava con agua destilada, se tapan los tubos de centrifuga con parafilm, se sumergen en un baño de ultrasonidos, se agitan manualmente y se vuelven a introducir en la centrifuga a 5000 rpm durante 3 minutos.

Esta operación se repite hasta que el sobrenadante tiene un pH neutro, que aproximadamente serán unos 8 ciclos de centrifuga y lavados.

Una vez que el sobrenadante alcanza el pH neutro, el sólido resultante se pasa a un vidrio de reloj y se seca durante toda la noche (unas 12 horas) a 80°C.

Una vez seco, el sólido se muele y se mete en horno mufla durante 4 horas con la siguiente rampa de temperaturas: 7°C/minuto hasta 1050°C y 4 horas a 1050°C

Pasadas las 4 horas a 1050°C y habiendo dejado enfriar el horno hasta los 600°C se retiran los crisoles cuidadosamente de la mufla con guantes de protección y pinzas de metal.

El sólido se deja enfriar al aire y, una vez frío, se guarda la muestra en desecador.

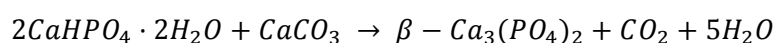
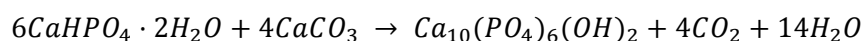


## 4.2 SÍNTESIS DE HA Y $\beta$ -TCP POR MÉTODO CERÁMICO

Se han realizado dos síntesis con los mismos reactivos en diferentes proporciones para la obtención de HA y  $\beta$ -TCP.

### 4.2.1 Reacción general

En ambos casos, para la obtención de HA y  $\beta$ -TCP se han seguido las reacciones propuestas por J. M. Villora y colaboradores.<sup>19</sup>



### 4.2.2 Reactivos

- DCPD Sigma-Aldrich (98-102.5%)
- $\text{Ca}(\text{OH})_2$  Riedel-de Haën (>96%)
- $\text{CaCO}_3$  Fluka (99%)

### 4.2.3 Material

- Mortero de ágata
- Espátula
- Crisol de cerámica
- Horno mufla Lenton LTF 15/50/180
- Prensa hidráulica Specac
- Molde para pastillas

### 4.2.4 Cálculos

Tabla 3 Cantidades utilizadas en la elaboración de HA y  $\beta$ -TCP

Síntesis	DCPD (g)	$\text{CaCO}_3$ (g)
HA	1.002	0.428
$\beta$ -TCP	1.001	0.291

#### 4.2.5 Procedimiento experimental

En un mortero de ágata se mezclan íntimamente las cantidades estequiométricas de DCPD y  $\text{CaCO}_3$  durante unos 10 minutos aproximadamente.

Ya mezclados los dos reactivos, se pasan al troquel y se les aplican 3 toneladas , dejándolo unos segundos.

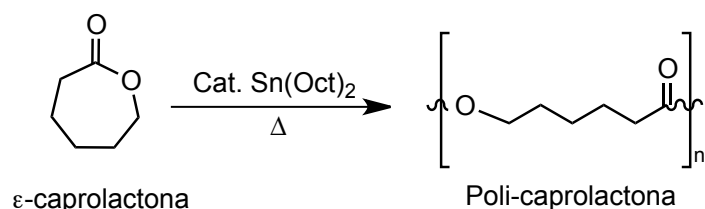
Una vez formadas las pastillas se introducen en un crisol de alúmina y éste en un horno mufla a  $1050^\circ\text{C}$  durante 18 horas.

Pasadas las 18 horas, se dejan enfriar las pastillas a temperatura ambiente, se vuelven a moler en un mortero de ágata y parte del producto se envía a caracterizar.

### 4.3 FUNCIONALIZACIÓN DEL BCP CON POLICAPROLACTONA

Se realizará el recubrimiento del BCP con una polimerización *in situ* de la  $\epsilon$ -caprolactona empleando un catalizador de estaño.

#### 4.3.1 Reacción general



En este caso se ha seguido el método de síntesis propuesto por Wang,Y. y colaboradores.<sup>34</sup>

#### 4.3.2 Reactivos

- $\epsilon$ -caprolactona Acros Organics (99%)
- $\text{Sn(Oct)}_2$  disuelto en octano
- Tolueno seco Alfa Aesar destilado sobre sodio
- Fosfato cálcico bifásico (BCP) obtenido en la síntesis previa
- Diclorometano Panreac

#### 4.3.3 Material

- Frasco lavador de gases y gomas
- Roscas y pinzas
- Matraz de fondo redondo de tres bocas de 100 mL
- Refrigerante Liebig de boca ancha
- Aparato Dean Stark
- Tubo de vidrio en L con adaptador pequeño
- Barra magnética
- Soporte de aluminio para matraz de 100 mL
- Placa calefactora IKA RTC Basic con sonda
- Burbujeador (Bubbler) con silicona líquida
- Vidrio de reloj
- Espátula
- Tapón con esmerilado grande y pequeño

- Septum de caucho
- Tubos de centrifuga
- Cristalizador pequeño
- Centrífuga Hettich Rotina 35

#### 4.3.4 Procedimiento experimental

Con todo el material previamente seco, en un matraz de fondo redondo de tres bocas de 100mL se introducen 40mL de tolueno seco y 2g de BCP. Se conecta el aparato Dean Stark provisto de un refrigerante, se hace pasar una corriente de  $N_2$  y se deja a ebullición hasta que se hayan recogido unos 10 mL de tolueno.

Una vez refluídos los 10 mL de tolueno se retira el aparato Dean Stark, dejando solamente el refrigerante, y se introducen por el septum 2 mL de  $\epsilon$ -caprolactona y 5.7mL de una disolución de 5.27mg/mL de  $Sn(Oct)_2$  el cual actúa como catalizador.

En cuanto se añade el catalizador (una disolución transparente) se aprecia que la suspensión blanca que teníamos previamente adquiere un tono blanco mucho más turbio.

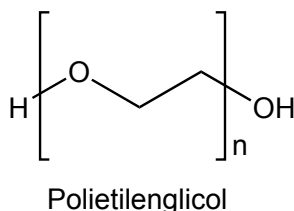
Una vez añadido el catalizador, se calienta la reacción a reflujo con ebullición fuerte durante 3.5 horas. Una vez pasadas las 3.5 horas se retira la calefacción y se deja enfriar hasta temperatura ambiente.

El sólido blanco en suspensión se reparte en dos tubos de centrifuga, se centrifuga a 2500 rpm durante 3 minutos y se retira el sobrenadante. El sólido de uno de los dos tubos se introduce en un cristalizador, se tapa con parafilm y se deja secar en campana durante 48 horas. El sólido resultante del otro tubo se lava con aproximadamente 10 mL de diclorometano, se agita bien y se introduce en la centrífuga de nuevo a 2500 rpm durante 3 minutos, una vez decantado el sólido, se vuelve a agitar y se introduce de nuevo en la centrífuga. Esta operación se repite en dos ocasiones más.

El sólido lavado con diclorometano se introduce en otro cristalizador, se tapa con parafilm y se deja secar en campana durante 48 horas.

#### 4.4 FUNCIONALIZACIÓN DEL BCP CON POLIETILENGLICOL

En esta ocasión se recubrirá el BCP con un polímero comercial denominado polietilenglicol de peso molecular 3000g/mol (PEG 3000)



##### 4.4.1 Reactivos

- Fosfato cálcico bifásico (BCP) obtenido en la síntesis previa
- PEG 3000 Merck
- Agua milli-Q

##### 4.4.2 Material

- Vial de 5mL con tapón
- Espátula
- Pipeta Pasteur
- Baño de ultrasonidos Selecta Ultrasons H-D

##### 4.4.3 Procedimiento experimental

En un vial de 5mL se introducen 0.1g de BCP y con una pipeta Pasteur se le añaden aproximadamente 0.1mL de agua milli-Q para formar una suspensión con el material cerámico. Una vez añadida el agua milli-Q el vial se cierra y se introduce en un baño de ultrasonidos durante un minuto para favorecer la suspensión del material cerámico en el agua.

Con la suspensión ya realizada, se añade aproximadamente el 20% en peso de PEG 3000, unos 0.020g, se vuelve a cerrar el vial, se agita manualmente y se vuelve a introducir en el baño de ultrasonidos durante dos minutos.



## 5 INSTRUMENTAL Y MÉTODOS

### 5.1 CARACTERIZACIÓN POR DIFRACCIÓN DE RAYOS X

La difracción de rayos X de polvo cristalino es una técnica de caracterización no destructiva comúnmente usada en la identificación cualitativa de las fases cristalinas presentes en un material, así como la determinación estructural en cada fase cristalina. Otras aplicaciones son: el análisis cuantitativo de compuestos cristalinos, la determinación de tamaños de cristales, también cálculos sobre la simetría del propio cristal, en especial la asignación de planos atómicos, la obtención de parámetros de red, e incluso la determinación de posiciones atómicas.<sup>2</sup>

La difracción tiene lugar cuando las ondas de una radiación se encuentran con una serie de obstáculos separados entre sí por una distancia regular entre ellos, y de la misma magnitud que la longitud de onda que el haz de radiación emitida. Estos obstáculos de los que se habla pueden ser las distancias interatómicas en los sólidos cristalinos que son del mismo orden que la longitud de onda de los rayos X, entre 0,6 y 1,9 Å. De esta forma la radiación X interactúa con los electrones del material siendo dispersada en todas las direcciones por los distintos planos atómicos y generando interacciones constructivas y destructivas.<sup>35</sup>

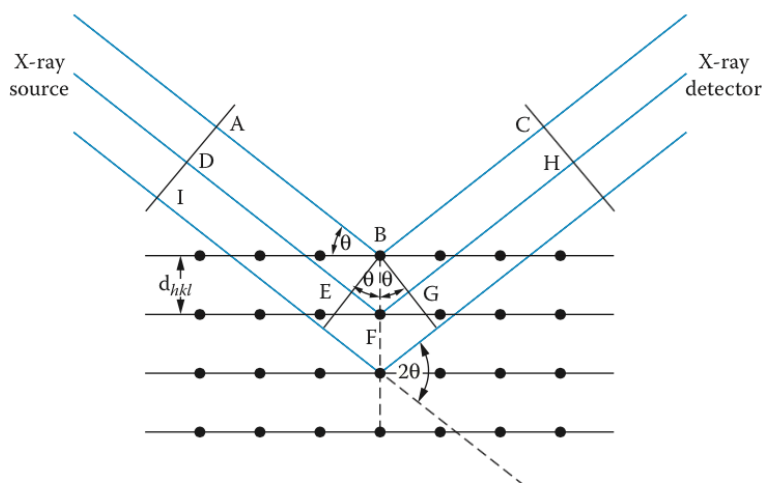


Figura 10 Condición de Bragg para la reflexión de rayos X<sup>35</sup>

De acuerdo con la ley de Bragg, las interferencias constructivas tienen lugar solo para aquellos planos cristalinos que cumplan la siguiente relación:

$$2 \cdot d_{hkl} \cdot \sin \theta = n \cdot \lambda$$

Donde  $d_{hkl}$  es la distancia interplanar,  $\theta$  es el ángulo de incidencia medido desde el plano cristalino que produce la reflexión,  $\lambda$  es la longitud de onda de los rayos X incidentes y  $n$  es el orden de la reflexión ( $n = 1, 2, 3 \dots$ ).

Los máximos de difracción a los que dan lugar, tendrán mayor o menor intensidad dependiendo del poder dispersor de los átomos implicados en el proceso.

La caracterización de las muestras se realiza con el difractómetro de rayos X *SIEMENS D5000* situado en el edificio del Servicio de Apoyo a la Investigación (SAI) de la Universidade de A Coruña.

La identificación de las fases cristalinas presentes en los difractogramas de rayos X se ha realizado mediante la comparación de los difractogramas experimentales con los difractogramas de la base de datos The International Centre for Diffraction Data (ICDD-2004)<sup>36</sup> empleando el programa Match!<sup>37</sup>.



Figura 11 Difractómetro de rayos X SIEMENS D5000<sup>38</sup>



## 5.2 CARACTERIZACIÓN POR ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJOS

La espectroscopia de infrarrojos es una técnica de caracterización utilizada para la identificación de bandas de absorción que se producen por la diferente vibración de los enlaces que forman un compuesto.<sup>38</sup> Cuando un compuesto absorbe radiación infrarroja, las vibraciones originadas con frecuencia igual a la de la radiación, aumentan en intensidad, lo que genera señales con frecuencias que corresponden a la vibración de un enlace específico.

En este caso se ha realizado la caracterización por espectroscopía de infrarrojos con transformada de Fourier (FTIR) de reflectancia total atenuada (ATR)(Figura 12).

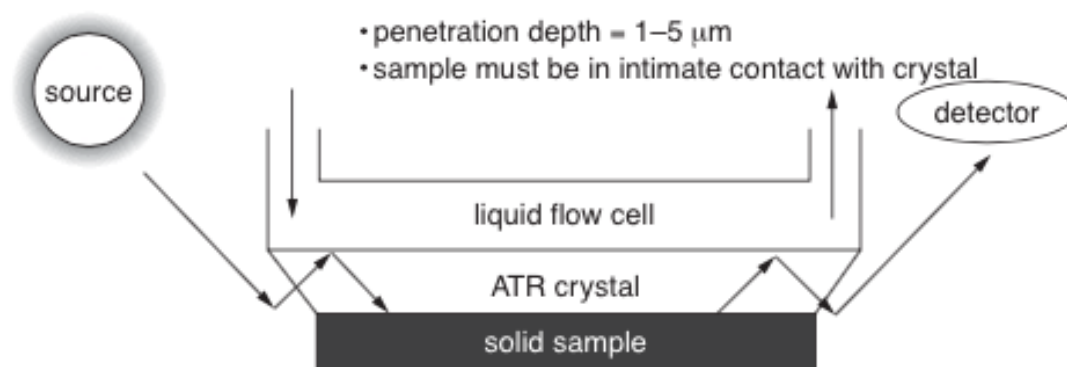


Figura 12 Esquema del FTIR-ATR <sup>2</sup>

Para la caracterización de los sólidos por FTIR-ATR se ha empleado el equipo *ThermoScientific Nicolet iS10* situado en el Centro de Investigaciones Científicas Avanzadas (CICA) de la Universidad de A Coruña y el equipo *Agilent Technologies Cary 630 FTIR Spectrometer* de la empresa Developbiosystem S.L., situada en Cedeira.

La caracterización de las muestras mediante espectroscopia de infrarrojos se ha realizado comparando el espectro obtenido con los que se encuentran en la base de datos del NIST<sup>39</sup> y del programa OMNIC<sup>40</sup> e identificando las bandas de vibración características de los grupos funcionales de las muestras por comparación con los datos de la biografía.<sup>41</sup>

La muestra en cuestión se sitúa sin ningún tratamiento previo sobre el portaobjetos del espectrómetro, se baja el cabezal de punta cónica y se inicia el barrido.



Figura 13 FTIR-ATR ThermoScientific Nicolet iS10
















Figura 14 FTIR-ATR Agilent Technologies Cary 630

### 5.3 CARACTERIZACIÓN POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

La microscopía electrónica es una técnica ampliamente utilizada en la caracterización de sólidos para estudiar su estructura, morfología y el tamaño de partícula, para examinar defectos y para determinar la distribución de los elementos que componen la muestra. El principio básico bajo el que se encuentra la microscopía electrónica es similar al de la microscopía óptica, excepto en el empleo de un haz de electrones en lugar de luz visible.<sup>2</sup>

En la Tabla 4 se detallan las resoluciones tanto del SEM como del TEM en comparación con el ojo humano y los microscopios ópticos.<sup>42</sup>

Tabla 4 Tabla comparativa de resoluciones del ojo humano, microscopio óptico, SEM y TEM <sup>42</sup>

Limit of Resolving Power	Object Size	Object	Magnification
Human Eye 	10 mm	Ant 	1X
	1 mm	Tick 	1X
Optical Microscope 	100 µm	Butterfly Scales 	1X
	10 µm	Pollen 	10X
		Red Blood Cells 	
	1 µm	Bacteria 	100X
Scanning Electron Microscope 	100 nm	Virus 	1,000X
	10 nm	Molecules (Not directly viewable) 	10,000X
Transmission Electron Microscope 	1 nm	Atoms 	100,000X
	0.1 nm	(Atomic Structure of Materials Viewable in TEM)	1,000,000X

### 5.3.1 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La microscopía electrónica de barrido (SEM) se emplea comúnmente para crear una imagen de la topografía de la superficie de un material. Como se puede ver en la Figura 15, un SEM tiene los siguientes componentes:<sup>2</sup>

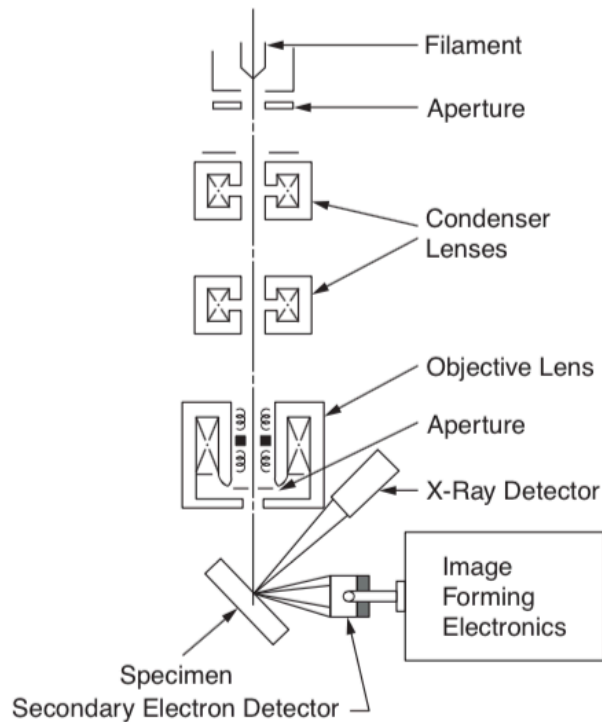


Figura 15 Esquema de componentes del SEM<sup>2</sup>

Un filamento de tungsteno, típicamente usado como el generador de haz de electrones, se calienta para generar electrones que son acelerados mediante una diferencia de potencial (habitualmente 30keV). El haz de electrones resultante se reduce y se enfoca hacia la superficie de la muestra usando un condensador y lentes, respectivamente. Finalmente, el haz de electrones se hace pasar por encima de la muestra usando bobinas de escaneo. La colisión del haz de electrones con la superficie de la muestra provoca dispersión elástica e inelástica generando una variedad de señales en las que se incluyen los electrones secundarios, electrones retrodispersados, rayos X, electrones Auger y radiación catódoluminiscente.<sup>2 18</sup>

Una de las señales muy empleadas en la caracterización de los materiales son los rayos X generados al interaccionar el haz de electrones y la muestra. Cuando el haz de electrones incide sobre el material da lugar a la emisión de rayos X característicos de los elementos que constituyen el material.

Esta técnica analítica es conocida como análisis de energía dispersa de rayos X (*Energy Dispersive Analysis of X-rays* EDX o EDAX).<sup>35</sup> y **se emplea para identificar la composición química del material.**

Tanto las micrografías SEM como el análisis EDX se han llevado a cabo en Developbiosystem S.L. situada en Cedeira. El equipo empleado en este caso es el *JEOL Nikon NeoScope JCM-6000*.



Figura 16 SEM JEOL Nikon NeoScope JCM-6000<sup>46</sup>

### 5.3.2 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

La microscopía electrónica de transmisión (TEM) proporciona una resolución significativamente más alta que un microscopio convencional que emplea luz visible. Un TEM produce una imagen directa de un sólido a gran aumento a partir de la transmisión de los electrones a través de una muestra.<sup>38</sup>

En el microscopio electrónico de transmisión (TEM) se irradia una muestra delgada con un haz de electrones de densidad de corriente uniforme, generado normalmente con un filamento de tungsteno o hexaboruro de lantano (Figura 17). Los electrones generados son acelerados mediante una diferencia de potencial dentro del intervalo de 100 a 300 kV. Cuando los electrones interactúan con la muestra parte de esos electrones son transmitidos, otra parte son dispersados y otra parte da lugar a interacciones que producen distintos fenómenos como emisión de luz, electrones secundarios y Auger, rayos X, etc.<sup>18 38</sup>

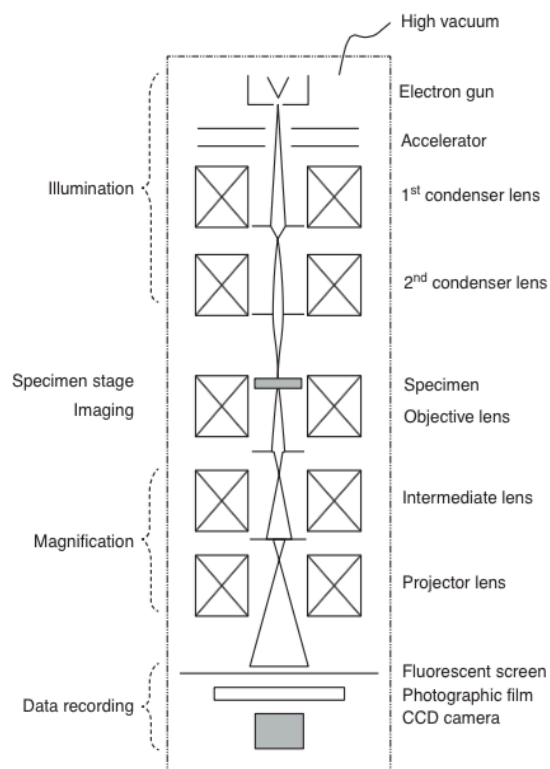


Figura 17 Esquema de componentes del TEM<sup>2</sup>

Para que se produzca la transmisión de electrones a través de la muestra es necesario que ésta sea delgada o que contenga elementos ligeros, es decir, transparente a los electrones. Es recomendable no utilizar muestras de más de 100

nm de grosor ya que cuanto menor sea el espesor de la muestra mejor calidad de imágenes se puede obtener.<sup>38</sup>

Para poder visualizar una muestra en el TEM, se debe dispersar una pequeña cantidad de la muestra a analizar en isopropanol y posteriormente depositar una gota de la suspensión sobre una rejilla circular de cobre con un polímero recubierto de carbón y dejarla secar.

La caracterización de la muestra se realizó con el microscopio *JEOL JEM 2010 de 100 kV que se encuentra* los Servicios de Apoyo a la Investigación (SAI) de la UDC.



Figura 18 Microscopio JEOL JEM 2010<sup>38</sup>

## 5.4 ENSAYO DE COMPRESIÓN

Los ensayos de compresión-deformación se realizan si las fuerzas que operan en servicio son de este tipo. En un ensayo de compresión la fuerza aplicada es compresiva y la probeta se contrae a lo largo de la dirección de la fuerza. Por convención, una fuerza de compresión se considera negativa y, por tanto, produce un esfuerzo negativo. Las Ecuaciones (1) y (2) se emplean para calcular el esfuerzo de compresión y la deformación respectivamente. Además, puesto que  $l_0$  es mayor que  $l_i$ , las deformaciones de compresión calculadas a partir de la Ecuación (2) son también necesariamente negativas. Los ensayos de compresión se utilizan cuando se desea conocer el comportamiento mecánico del material bajo esfuerzos de compresión, tal como ocurren en los procesos de conformación, o bien en condiciones de servicio, como por ejemplo los huesos que tienen que soportar importantes cargas de compresión.<sup>17</sup>

$$\text{Ecuación (1) esfuerzo } \sigma = \frac{F}{A_0}$$

$$\text{Ecuación (2) deformación } \epsilon = \frac{l_i - l_0}{l_0}$$

En los ensayos de compresión realizados se ha empleado una máquina de ensayos universal *SHIMADZU AGS-X 10 kN autograph* perteneciente a la empresa Develop Biosystem S.L., situada en Cedeira.

Para realizar los ensayos de compresión se han conformado varias probetas de alturas similares (aproximadamente 6 mm) y con un diámetro de 4.4 mm introduciendo cierta cantidad de material cerámico en un troquel y aplicando presión manualmente con el émbolo del mismo. Una vez conformadas las probetas se les ha realizado un tratamiento térmico a 1050°C durante 4 horas.

Los ensayos de compresión se han realizado adaptando la norma ISO 13175 de ensayos de compresión, empleando probetas cilíndricas en lugar de cubos, empleando la velocidad recomendada por la norma (0,5 mm/min), midiendo todas las probetas empleadas para normalizar los resultados y deteniendo el ensayo cuando el desplazamiento alcanza el 50% del valor de la altura de cada probeta.



El ensayo de compresión consta de tres etapas diferenciadas:

- Las probetas se sitúan en el centro de las placas que van a realizar la fuerza para comprimirlas y se aproximan hasta que se la superficie de la probeta toca con la placa superior de la máquina universal de ensayos.
- Una vez situada la placa se ajustan todos los parámetros a cero (tanto fuerza como desplazamiento) y se inicia el ensayo de compresión.
- Alcanzado el 50% del valor de la altura de la probeta en el desplazamiento de la placa, se detiene el ensayo y se retira la probeta.

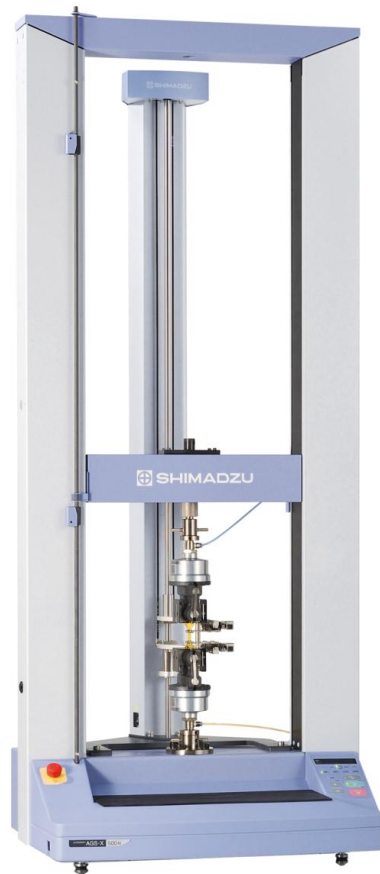


Figura 19 Máquina de ensayos universal SHIMADZU AGS-X 10 kN autograph<sup>47</sup>

## 5.5 ANÁLISIS TERMOGRAVIMÉTRICO

El análisis termogravimétrico (TGA) está basado en la medida de la variación de la masa de una muestra cuando dicha muestra se somete a un programa de temperatura en una atmósfera controlada. Esta variación de masa puede ser una pérdida de masa o una ganancia de masa.

La pérdida de agua debido a la cristalización, o la pérdida de elementos volátiles tales como el oxígeno muestran una pérdida de peso. La oxidación o la adsorción de gas muestra una ganancia de peso.<sup>35</sup>

En este caso el análisis lo ha realizado el personal del Servicio de Apoyo a la Investigación (SAI) de la Universidad de A Coruña y se ha empleado un analizador STA/TG-DSC (*Simultaneous Termogravimetry – Diferencial Scanning Calorimetry*) Netzsch STA 449 Jupiter.<sup>43</sup>

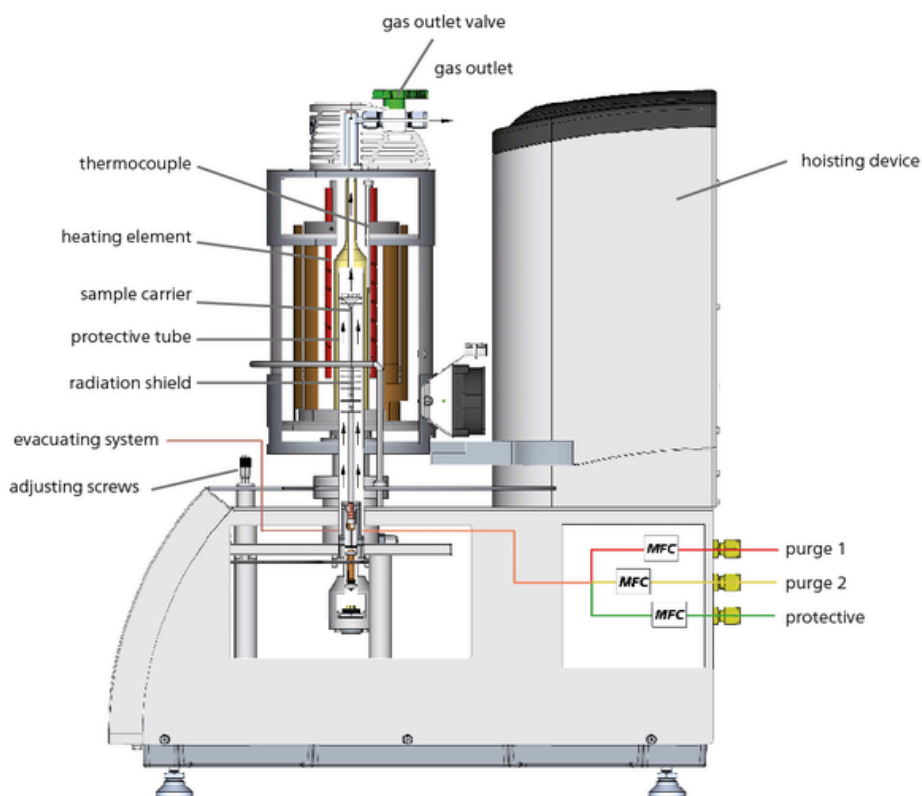


Figura 20 Esquema DSA/TG-DSC<sup>43</sup>

Los ensayos se realizaron realizando un calentamiento constante de la muestra a 5 °C/min desde temperatura ambiente hasta 1100°C en atmósfera de nitrógeno.

## 6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 CARACTERIZACIÓN DE HA, $\beta$ -TCP Y BCP PREPARADOS MEDIANTE VÍA HÚMEDA

#### 6.1.1 Caracterización del precursor CDHA

Como se ha comentado en el apartado 4.1 Síntesis de HA,  $\beta$ -TCP y BCP mediante vía húmeda, la preparación de estos materiales se realiza mediante dos etapas obteniéndose en la primera de ellas un material precursor CDHA. Se ha realizado la caracterización de este compuesto mediante difracción de rayos X y TGA.

Como se puede observar en la Figura 21, a la vista del difractograma del CDHA (en azul) y del patrón proporcionado por la base de datos de la hidroxiapatita (en rojo) podemos concluir que efectivamente lo que tenemos es un sólido con las características estructurales de la hidroxiapatita. Indicar que la base de datos no dispone del patrón de la CDHA por lo que se ha empleado como referencia HA.

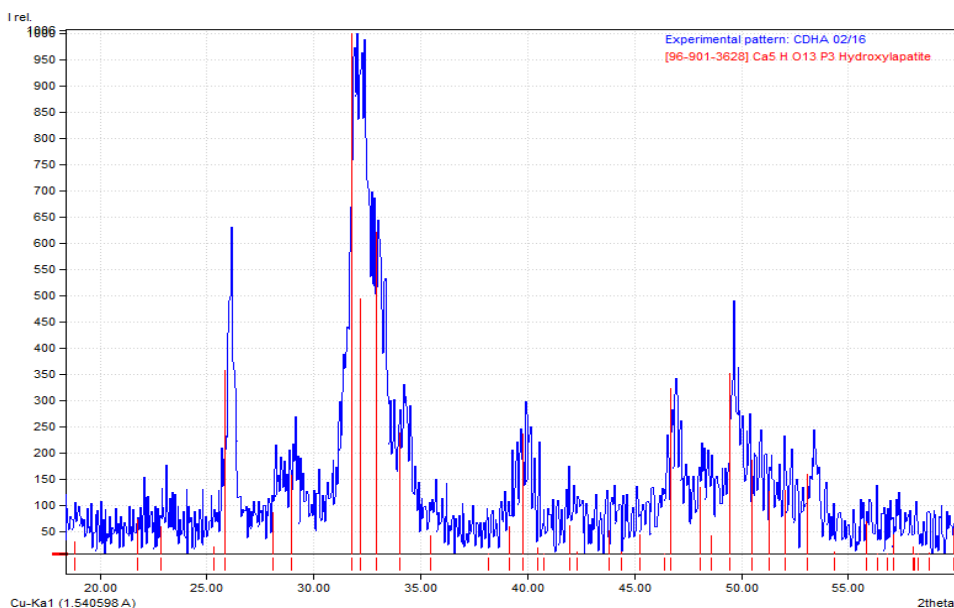


Figura 21 Difractograma de rayos X de polvo de la muestra de CDHA.

Por otra parte, hay que señalar que los máximos de difracción son anchos, lo cual nos indica que el tamaño de las partículas cristalinas es muy pequeño del orden de nanómetros. El pequeño tamaño de partícula es debido a la baja temperatura del tratamiento térmico, en este caso de 100°C.

Para completar la caracterización del CDHA se ha realizado un estudio de la estabilidad térmica del compuesto mediante TGA. En la Figura 22 se muestra la pérdida de masa del material cuando se calienta desde temperatura ambiente hasta 1100°C en atmosfera de nitrógeno. Como se observar en la figura hay una pérdida inicial de menos del 0.5% en peso debida al agua adherida a la cerámica, a lo que le sigue una pérdida gradual de peso desde el 99.5% hasta aproximadamente el 92%. La fórmula molecular del CDHA es  $Ca_{10-x}(HPO_4)_x(PO_4)_{6-x}(OH)_{2-x}$  y, a la vista del análisis termogravimétrico podemos suponer que se debe a la pérdida de agua conformacional, e a la pérdida de agua formada por la descomposición del  $HPO_4^{2-}$  y el  $OH^-$  para formar  $PO_4^{3-}$  y el  $H_2O$  que se elimina.<sup>12 22</sup>

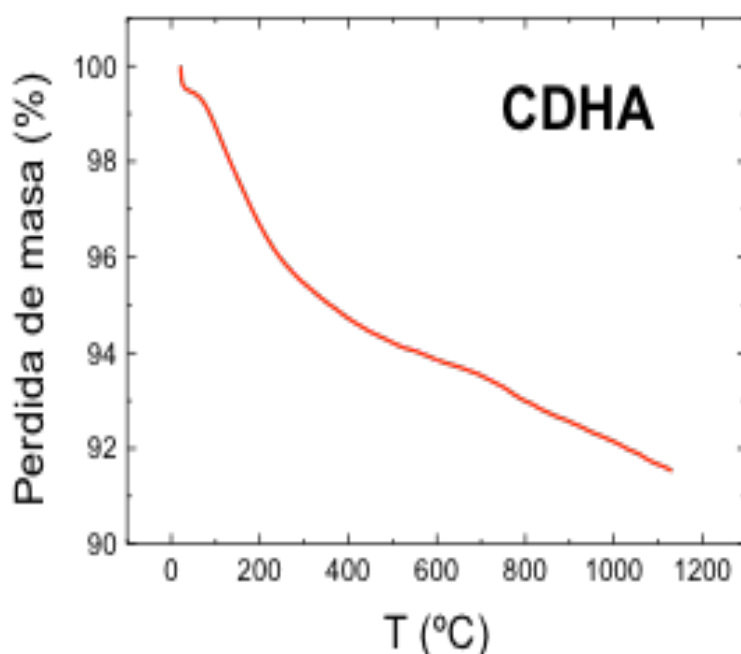


Figura 22 Análisis termogravimétrico de la CDHA.

### 6.1.2 Caracterización del BCP

Una vez realizado el tratamiento térmico del precursor de CDHA a 1050°C durante 4 horas se ha vuelto a caracterizar el sólido resultante mediante diferentes técnicas para determinar su composición química, fases cristalinas, estabilidad térmica y morfología.

#### 6.1.2.1 Caracterización mediante difracción de rayos X de polvo

El sólido obtenido a partir del tratamiento térmico del precursor de CDHA se ha caracterizado mediante difracción de rayos X de polvo.

En la Figura 23, se muestra el difractograma de rayos X de polvo del material BCP.

A la vista de los resultados obtenidos por la difracción de rayos X (en azul) y la comparación con los dos patrones de HA (en rojo) y  $\beta$ -TCP (en verde) podemos confirmar que las fases presentes en el fosfato cálcico bifásico son la hidroxiapatita y el  $\beta$ -fosfato tricálcico.

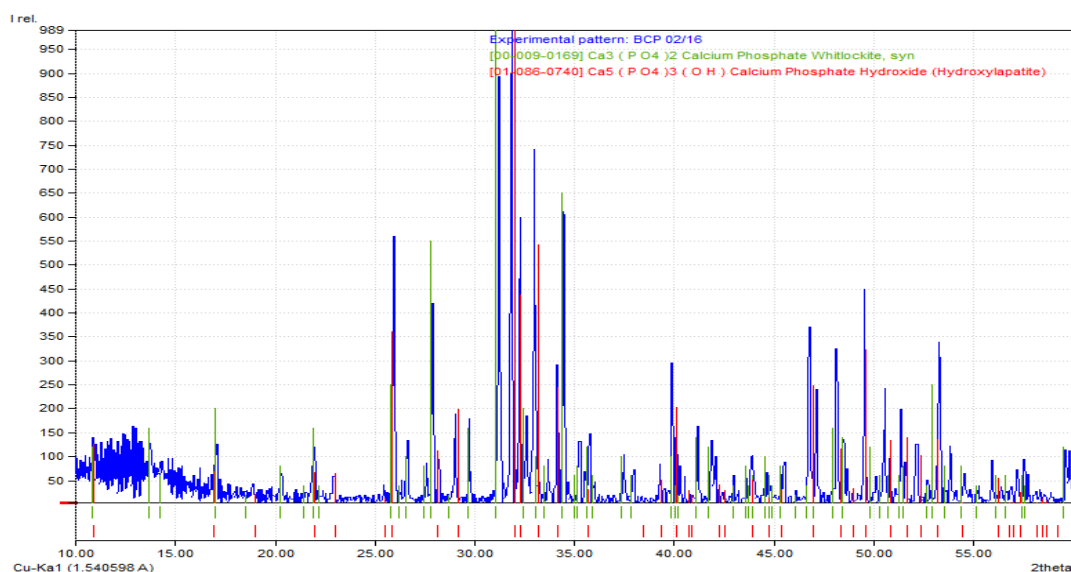


Figura 23 Difractograma de la muestra de BCP preparado mediante vía húmeda

El programa Match! también nos proporciona información orientativa sobre el porcentaje de muestra que pertenece a cada fase midiendo todos los picos presentes en el difractograma y comparando sus intensidades relativas. Así obtenemos que la relación aproximada de HA/ $\beta$ -TCP es de 54%/46%, siendo éste el resultado esperado en función de la cantidad de reactivos que habíamos añadido en el momento de la elaboración del BCP.

### 6.1.2.2 Caracterización mediante espectroscopia de infrarrojos

Una vez sintetizado el BCP se le ha realizado un análisis por FTIR-ATR obteniéndose el espectro mostrado en la Figura 24.

Como se puede observar, el espectro presenta dos bandas bastante intensas a  $1000\text{cm}^{-1}$  y a  $500\text{cm}^{-1}$  y una banda muy poco intensa a  $3600\text{cm}^{-1}$ . Teniendo en cuenta a composición química del BCP, solo pueden ser activos en IR los aniones fosfatos ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) y el hidroxilo ( $\text{OH}^-$ ) de la hidroxiapatita.

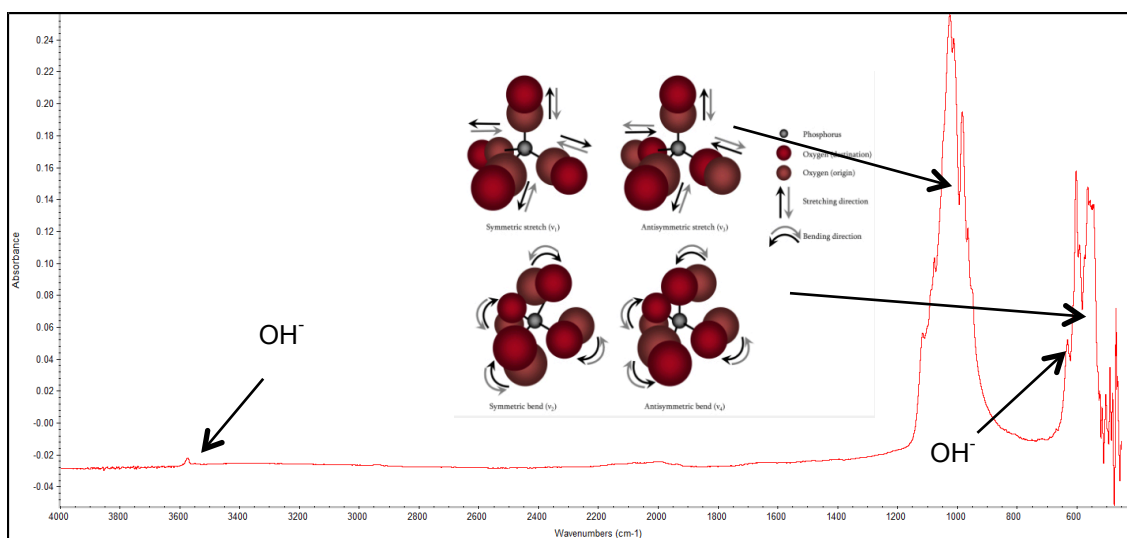


Figura 24 Espectro IR del BCP preparado mediante vía húmeda.

En este contexto, el anión fosfato presenta cuatro tipos de vibraciones: deformaciones de flexión(O-P-O) asimétrica y simétrica y deformaciones de tensión (P-O) asimétrica y simétrica, ver esquema de la Figura 24. De las cuales solo son activas en IR las deformaciones de flexión y tensión asimétricas.<sup>10 44</sup>

La banda intensa de  $1000\text{cm}^{-1}$  corresponde con la deformación de tensión asimétrica del anión fosfato, y la banda de  $500\text{cm}^{-1}$  corresponde con la deformación de flexión asimétrica del anión fosfato. Mientras que la banda débil que aparece a  $3600\text{cm}^{-1}$  corresponde a la vibración de tensión del hidroxilo ( $\text{OH}^-$ ).<sup>10 44</sup>

Además, en la banda de flexión asimétrica, se puede observar una banda solapada a unos  $630\text{cm}^{-1}$  que también pertenece a la vibración del grupo  $\text{OH}^-$ .<sup>10 44</sup>

### 6.1.2.3 Caracterización mediante TGA

Se ha realizado un estudio de la estabilidad térmica del BCP mediante TGA. En la Figura 25, se muestra la pérdida de masa del material cuando se calienta desde temperatura ambiente hasta 1100°C. Como se puede observar, en figura hay dos regiones de pérdida de masa: una primera pérdida brusca de masa (en torno a un 0.75%) hasta 200°C y una segunda pérdida gradual de masa (aproximadamente del 1.75%) desde 200°C hasta 1100°C. La primera pérdida de masa (hasta 200°C) puede ser debida al agua superficial adherida al BCP y la segunda pérdida de masa, según la bibliografía,<sup>12</sup> se debe a la eliminación de agua conformacional, es decir agua ocluida en el interior de la estructura cristalina.

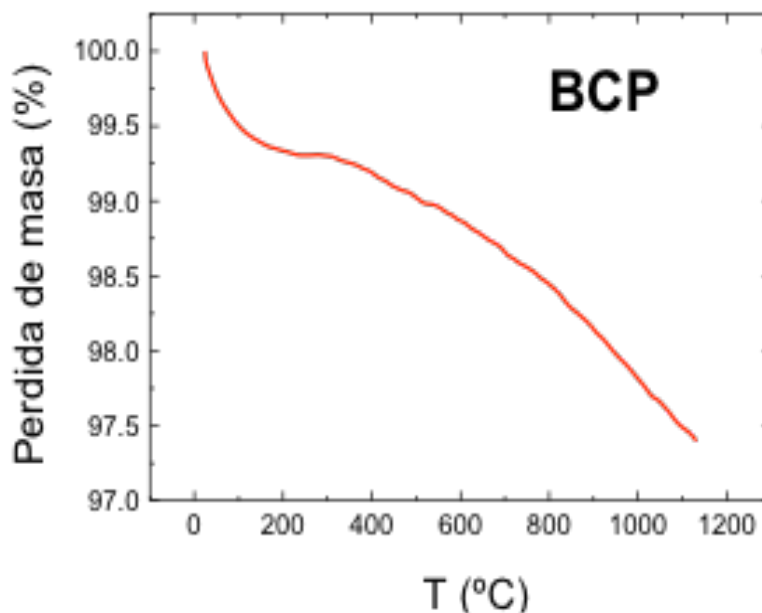


Figura 25 Análisis termogravimétrico del BCP

Por lo tanto, el BCP obtenido es un material estable que no se descompone hasta una temperatura de 1100°C. También hay que indicar que es un compuesto higroscópico, absorbe humedad del medio en la superficie, y además también se observa que presenta agua ocluida en la estructura posiblemente relacionada con el método de preparación mediante vía húmeda.

#### 6.1.2.4 Caracterización morfológica y composicional mediante SEM

Un aspecto muy importante de las biocerámicas es la porosidad del material, ya que es importante que el material sea poroso para facilitar la interacción entre la biocerámica y el tejido celular.

En la Figura 26 se muestran micrografías obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) del BCP sintetizado por vía húmeda. Como se puede observar el material obtenido mediante este método es bastante poroso y presenta un tamaño de partícula regular y de aproximadamente  $1\mu\text{m}$ .

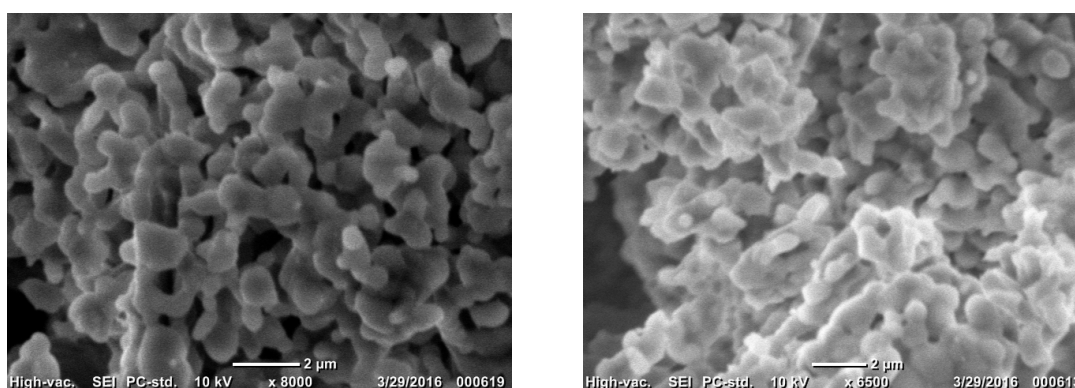


Figura 26 Micrografías SEM del BCP a 8000 aumentos y a 6500 aumentos respectivamente

También se ha realizado un análisis de la composición química del material mediante EDX. En la Figura 27 se muestra el espectro de EDX donde se indica el elemento químico a que corresponde cada emisión de rayos X y recoge una tabla con un análisis semicuantitativo de los elementos químicos presentes en la muestra.

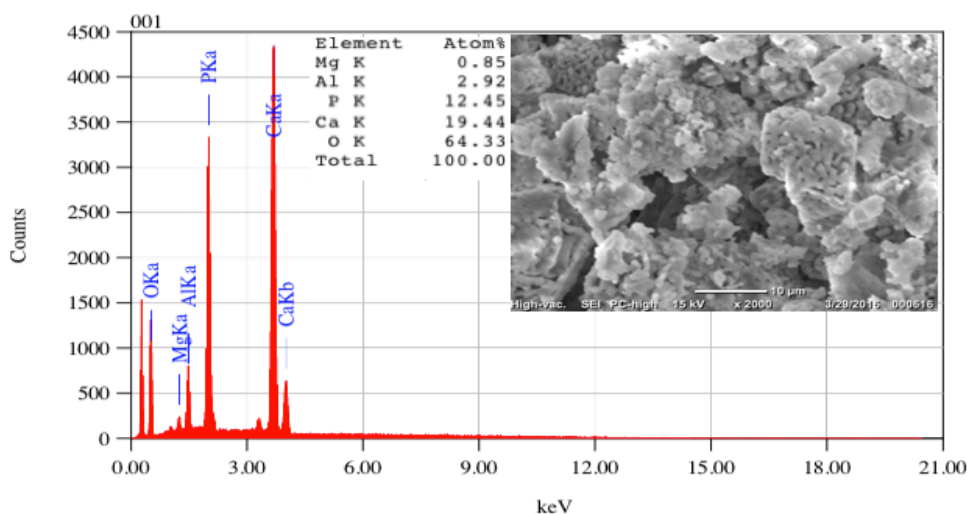


Figura 27 Análisis EDX y micrografía SEM del BCP a 2000 aumentos



En este caso se observan la presencia de Ca, P, y O que son elementos esperados teniendo en cuenta la composición del material. No se observa la presencia de hidrogeno, ya que este elemento es demasiado ligero para poder ser detectado por esta técnica. Indicar que el análisis EDX indica la presencia Al y Mg que es debida al portamuestra empleado para realizar el experimento. También cabe destacar que no se ha detectado la presencia de cationes potasio, ya que en la reacción se emplea una gran cantidad de KOH, si no se hubiesen realizado bien los lavados previos al tratamiento térmico, el catión  $K^+$  podría sustituir al  $Ca^{2+}$ . Por lo tanto se puede concluir, que se realizaron los lavados correctamente y la muestra no está contaminada con cationes  $K^+$  en la posición del catión  $Ca^{2+}$ .

Por otra parte, haciendo los cálculos del ratio  $Ca/P=1.56$  obtenido a partir del análisis EDX, este valor es muy próximo al valor esperado para este material  $Ca/P=1.58$ .<sup>22</sup> Por lo tanto, podemos concluir que la síntesis de BCP 50/50 (HA/ $\beta$ -TCP) ha arrojado los resultados esperados.

### 6.1.3 Caracterización de la HA y el $\beta$ -TCP

También se realizó la síntesis de HA y  $\beta$ -TCP puros mediante el método de vía húmeda siguiendo el procedimiento experimental descrito en la bibliografía.<sup>22</sup> En la Figura 28 y Figura 29 se muestran los difractogramas de rayos X de polvo obtenidos tras el tratamiento térmico a 1050°C. Como se puede observar ambos difratogramas se obtiene una mezcla de HA y  $\beta$ -TCP.

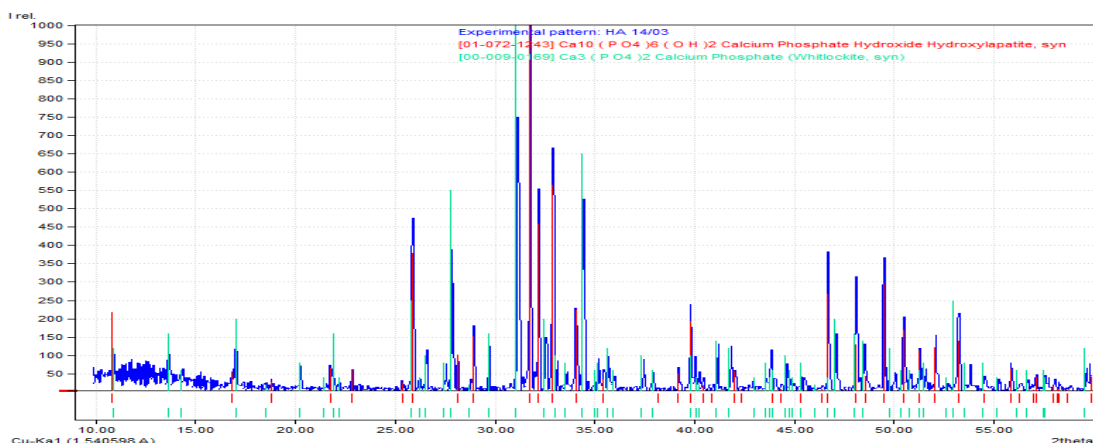


Figura 28 Difractograma de la muestra de HA obtenida por vía húmeda

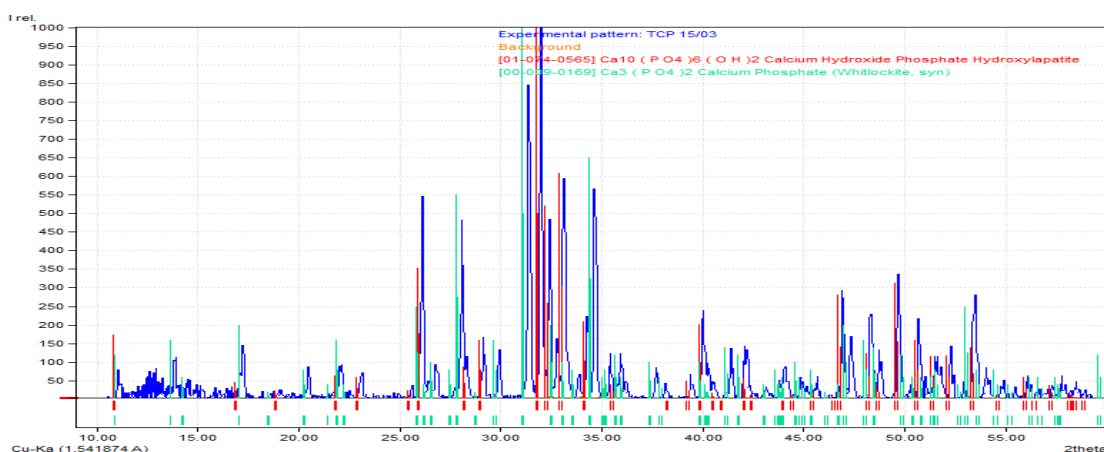


Figura 29 Difractograma de la muestra de  $\beta$ -TCP obtenido por vía húmeda

Por tanto, la síntesis por vía húmeda de los compuestos de HA y  $\beta$ -TCP puros no ha tenido éxito, posiblemente debido a un problema del escalado ya que en la bibliografía la síntesis de estos materiales se describe empleando una disolución de 1 litro mientras que en este trabajo se ha realizado la síntesis empleando una disolución de 100 ml.

## 6.2 CARACTERIZACIÓN DE HA Y $\beta$ -TCP PREPARADOS MEDIANTE VÍA SECA

Dado que la síntesis por vía húmeda para los compuestos puros no ha dado el resultado esperado se procedió a la síntesis por vía seca empleando  $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{CaCO}_3$  como reactivos de partida. Como se ha descrito en el apartado 4.2 Síntesis de HA y  $\beta$ -TCP por método cerámico, se ha empleado un método cerámico donde se mezclan homogéneamente los reactivos de partida mediante molienda en un mortero de ágata, y después se realiza un empastillado del material que es calentado a  $1050^\circ\text{C}$  en un horno mufla durante 18 horas.

### 6.2.1 Caracterización mediante difracción de rayos X de polvo

La pureza del material obtenido después del tratamiento térmico se ha determinado mediante difracción de rayos X de polvo. En la Figura 30 y la Figura 31, se muestran los difractogramas de rayos X de polvo obtenidos tras el tratamiento térmico a  $1050^\circ\text{C}$ .

Como se puede observar en ambos difractogramas, los máximos de difracción correspondientes a la muestra (en azul) y los picos correspondientes al patrón (en rojo) coinciden. Por tanto, se puede concluir que el método de síntesis por vía seca ha arrojado los resultados esperados, obteniéndose tanto la HA sin presencia aparente de  $\beta$ -TCP y viceversa.

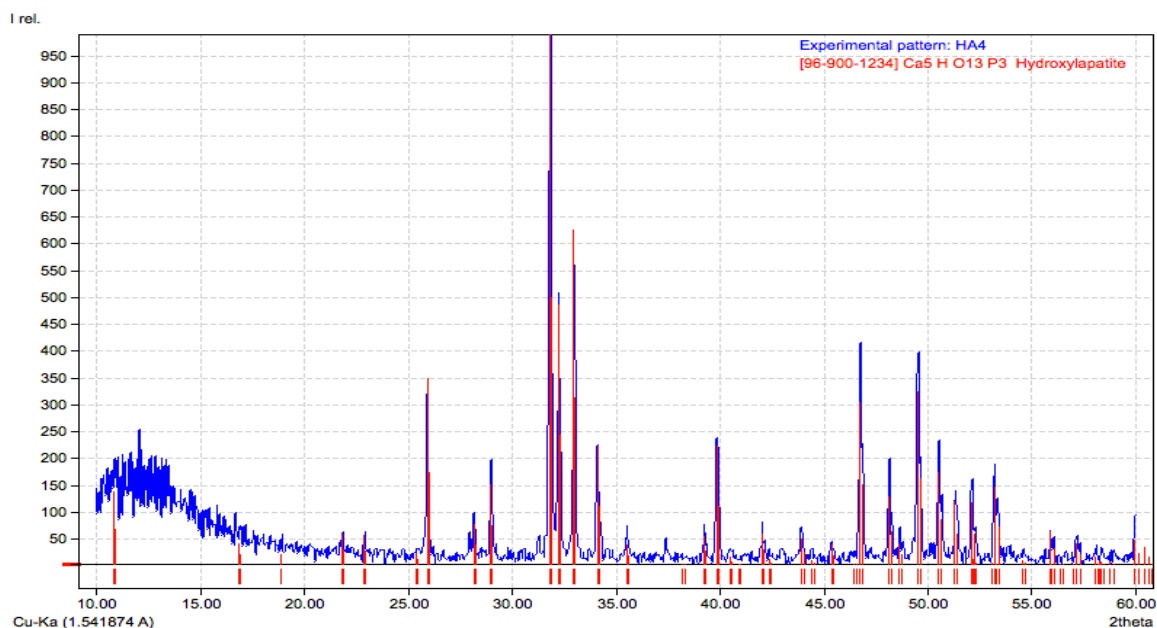


Figura 30 Difractograma de la muestra de HA obtenida mediante vía seca.

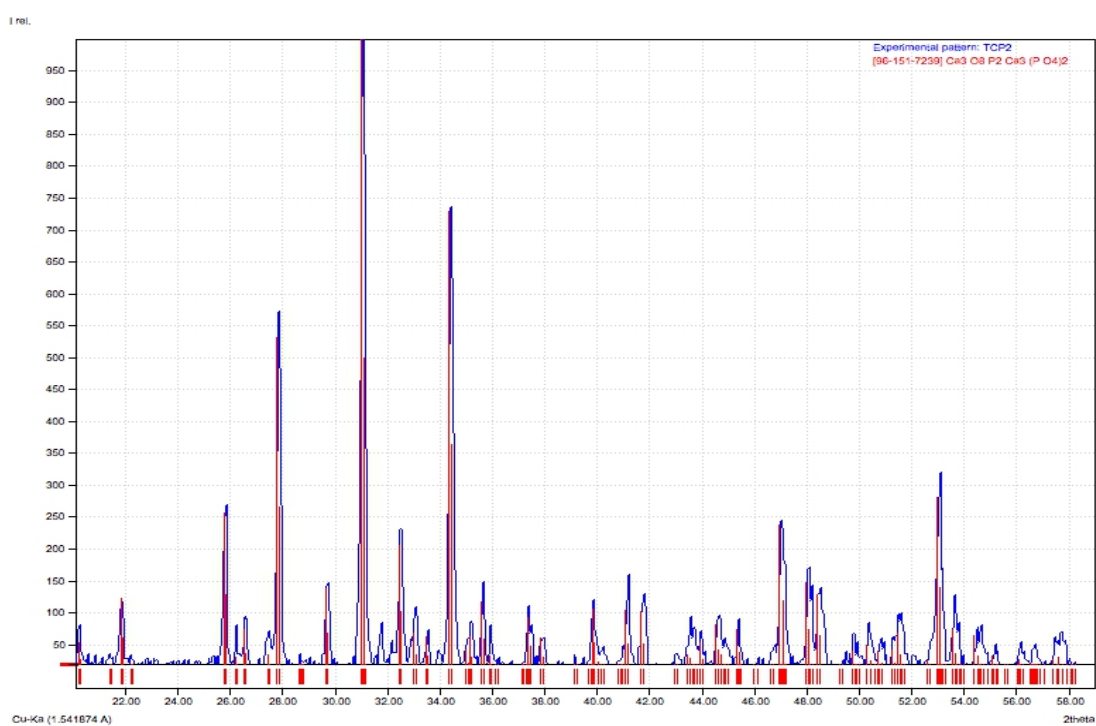


Figura 31 Difractograma de la muestra de  $\beta$ -TCP obtenido por vía seca

### 6.2.2 Caracterización mediante espectroscopia de infrarrojos

Dado que la difracción por rayos X había dado resultados en los que se deducía que cada compuesto sintetizado por vía seca se había obtenido puro, se le ha realizado un análisis FTIR-ATR para confirmarlo.

En la Figura 32 se muestran los espectros de IR tanto de la HA como del  $\beta$ -TCP sintetizados por el método cerámico o vía seca

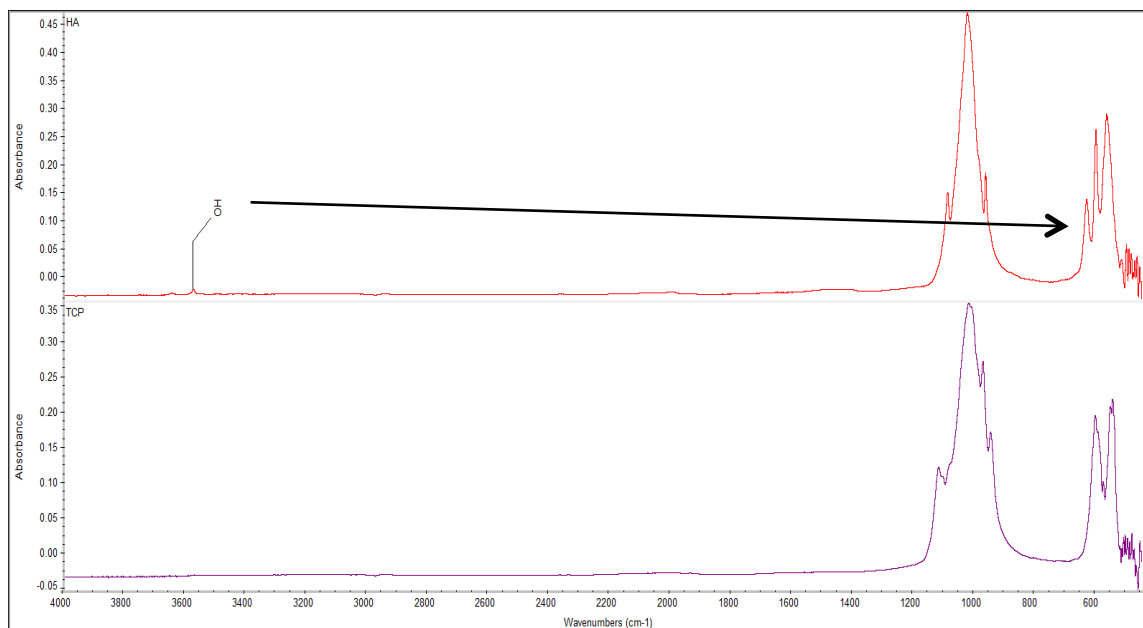


Figura 32 Espectros IR de HA (superior) y  $\beta$ -TCP(inferior) puros

Como se puede observar en la Figura 32, ambos compuestos presentan las bandas características del anión fosfato a  $1000\text{ cm}^{-1}$  y  $600\text{ cm}^{-1}$ . Adicionalmente en el espectro de la HA, en torno a los  $3600\text{ cm}^{-1}$  y  $630\text{ cm}^{-1}$  se pueden observar unas bandas correspondientes a las vibraciones de aniones hidroxilos, que no se observan en el espectro del  $\beta$ -TCP.<sup>44</sup> Estos resultados confirman de los materiales son puros y no hay una mezcla de fases.

Por tanto se puede concluir que tanto la síntesis de HA como de  $\beta$ -TCP por vía seca ha resultado ser satisfactoria.

### 6.2.3 Caracterización de la morfología mediante SEM

Se ha determinado la morfología de la HA y  $\beta$ -TCP puros mediante microscopía electrónica de barrido. Como se puede observar en las Figura 33 y Figura 34 ambos materiales son bastante porosos y presentan un tamaño de grano homogéneo. El tamaño de partícula de la HA y  $\beta$ -TCP preparados mediante el método cerámico es de aproximadamente  $2\mu\text{m}$ , siendo el doble del observado con el BCP preparado mediante vía húmeda. Indicar que esta diferencia de tamaños de partícula es habitual entre ambos métodos, en el caso de la vía húmeda, se utiliza un precursor de tamaño de partícula nanométrico y tiempos de síntesis más cortos lo cual favorece pequeños tamaños de partícula. Por otra parte, en los métodos de vía seca, los materiales precursores tienen un tamaño de partícula habitualmente del orden de la micra y los tiempo de síntesis son relativamente largos, lo que favorece la formación de tamaños de partícula mayores.

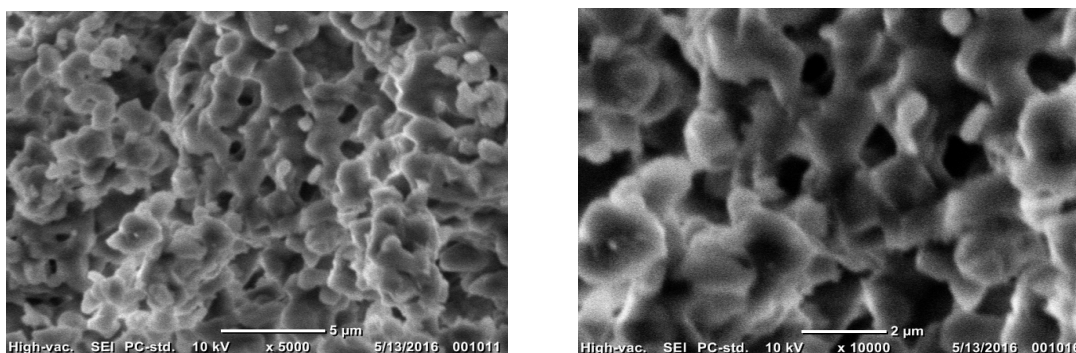


Figura 33 Micrografías SEM de  $\beta$ -TCP puro a 5000 y 10000 aumentos

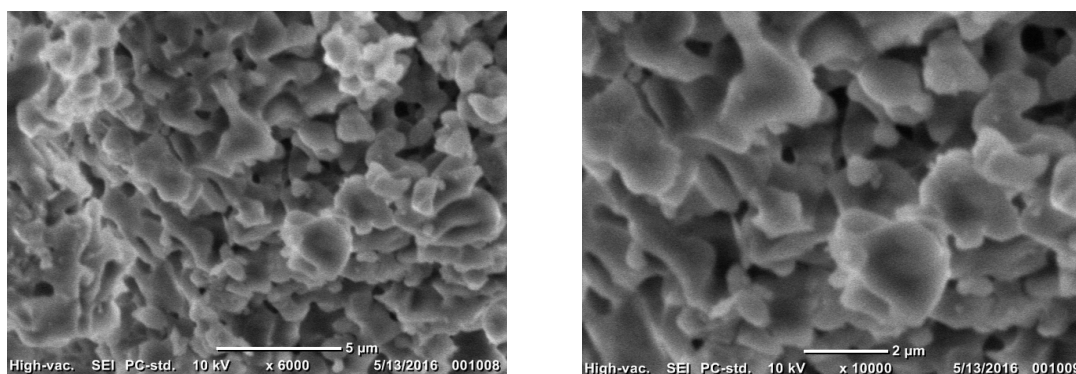


Figura 34 Micrografías SEM de HA pura a 6000 y 10000 aumentos

### 6.3 CARACTERIZACIÓN DEL BCP FUNCIONALIZADO

Como se comenzó en la sección de introducción, en el campo de la regeneración ósea, además del empleo de *scaffolds*, es habitual emplear hidrogeles que contienen partículas de BCP recubiertas con un polímero. Por ello, una vez preparado y caracterizado el BCP se ha llevado a cabo la funcionalización de la superficie de este material mediante policaprolactona (PCL) y polietilenglicol (PEG).

#### 6.3.1 Caracterización del recubrimiento con PCL

Una vez realizada la funcionalización del BCP con la PCL, como se ha explicado anteriormente en el procedimiento experimental, la suspensión del biocomposite en tolueno obtenida se separa en dos tubos de centrifuga, uno de los cuales simplemente se decanta y el otro se lava con 10 mL de diclorometano.

En la Figura 35 se muestran los espectros de IR de las dos alícuotas comparándolos con el patrón de policaprolactona de la base de datos del programa OMNIC.<sup>40</sup>

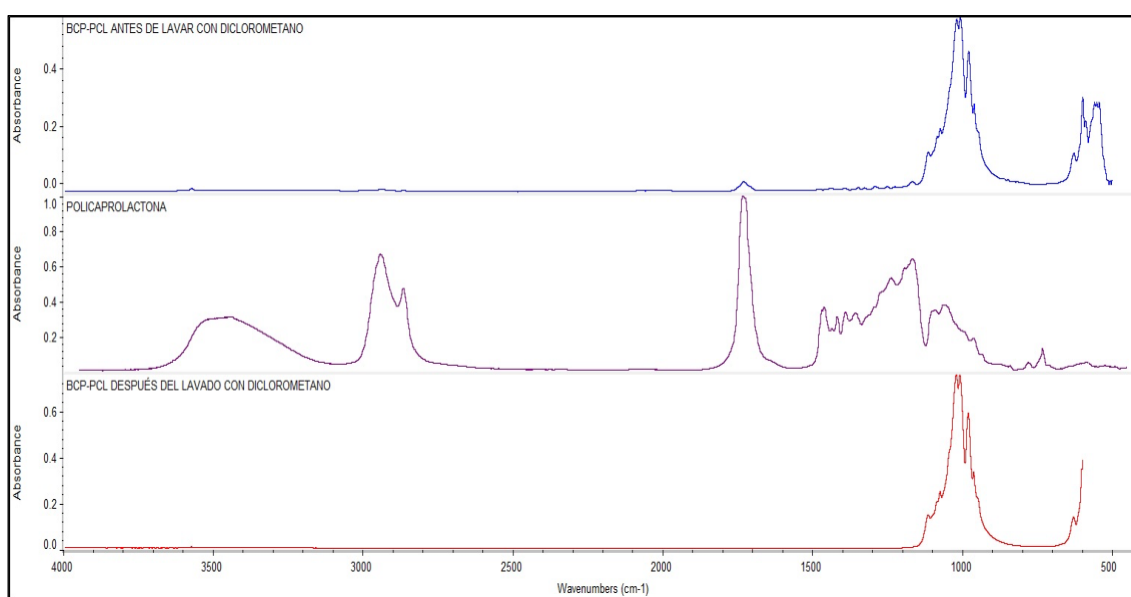


Figura 35 Espectros de IR del BCP recubierto con PCL antes y después de haber sido lavados con diclorometano, en el medio, el patrón de policaprolactona

El espectro superior (en azul), correspondiente a la muestra antes de realizar lavados, se puede observar que presenta bandas a unos  $1700\text{cm}^{-1}$  que se corresponden a la policaprolactona, ya que se han comparado con su patrón (en violeta). A la vista de los resultados se puede afirmar que hay evidencias de la presencia de policaprolactona en la muestra, aunque en muy poca cantidad con respecto a la cerámica, ya que la intensidad relativa de las bandas características de la policaprolactona es mucho menor.



Sin embargo, en el espectro inferior (en rojo), correspondiente al espectro del composite después de ser lavado con diclorometano, las bandas correspondientes a la policaprolactona ya no están presentes y por tanto se puede concluir que los lavados con el diclorometano han eliminado la policaprolactona y por tanto el recubrimiento no ha resultado efectivo.

Para confirmar los resultados que se han obtenido mediante los estudios de FTIR, se ha llevado a cabo la caracterización de los materiales mediante microscopia electrónica de transmisión. En la Figura 36, se muestra imágenes del BCP antes de realizar la funcionalización con PCL, donde se puede observar que la partícula de BCP tienen un tamaño aproximado de  $1\mu\text{m}$  coincidiendo con tamaño obtenido mediante microscopia electrónica de barrido. En la Figura 37, se muestran las partículas después de realizar la funcionalización con PCL y antes de realizar los lavados con diclorometano.

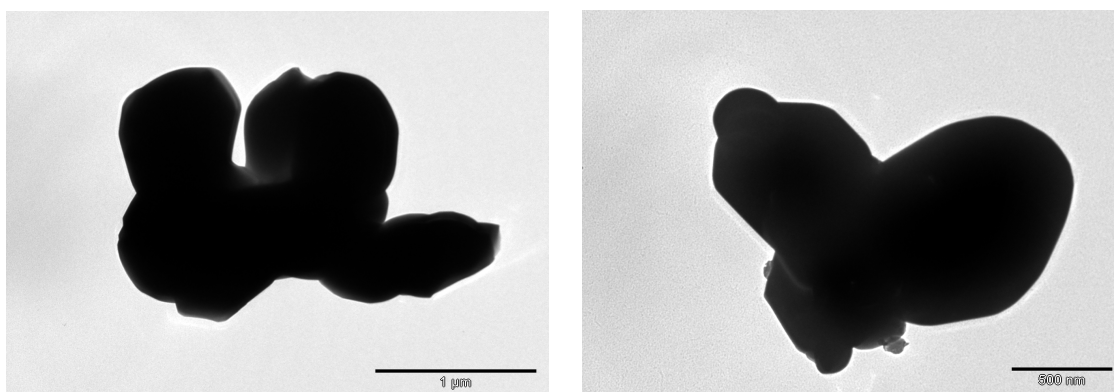


Figura 36 Micrografías TEM de BCP

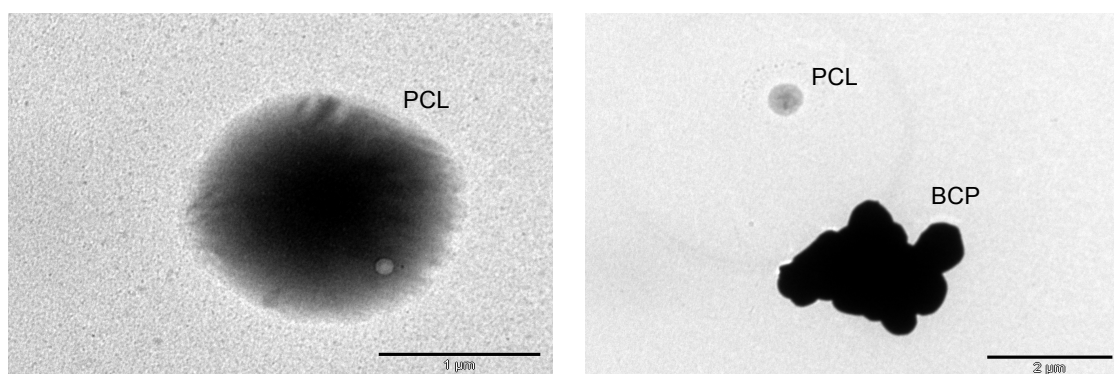


Figura 37 Micrografías TEM de PCL y BCP con PCL antes del lavado con diclorometano



Como se puede observar en las figuras, además de las partículas de BCP en la muestra se observa la presencia de partículas esféricas de PCL. En todos los casos se ha observado que las partículas de BCP no están recubiertas con PCL, si no que la PCL forma esferas independientes. Finalmente en la Figura 38, se muestran imágenes del material lavado con diclorometano, en este caso no se observa la presencia de partículas esféricas de PCL. Por lo tanto, estos resultados confirman los resultados obtenidos con FTIR-ATR, ya que el material polimérico no se ha adherido a la superficie del BCP, sino que se obtienen partículas de PCL que no interaccionan con el BCP. Al no estar adherida la PCL al BCP, los lavados con diclorometano eliminan todas las partículas de PCL.

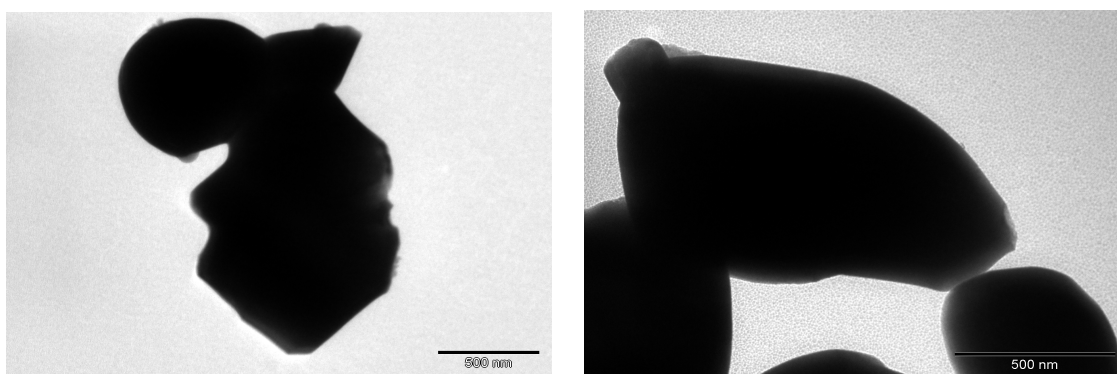


Figura 38 Micrografías TEM de BCP y PCL después del lavado con diclorometano

### 6.3.2 Caracterización del recubrimiento con PEG

Ya realizada la suspensión de BCP con PEG en agua, ésta se deja secar en un vidrio de reloj para poder caracterizarla mediante FTIR-ATR (Figura 39), dando como resultado el siguiente espectro.

A la vista del espectro de BCP recubierto con PEG y comparándolo con el patrón de PEG de la base de datos del OMNIC, se puede observar que las bandas características del PEG están presentes en la muestra, junto con las bandas del BCP, aunque las bandas del PEG son menos intensas. Por tanto, para confirmar que el polímero ha recubierto con éxito el BCP, debemos realizar micrografías TEM que confirmen el recubrimiento.

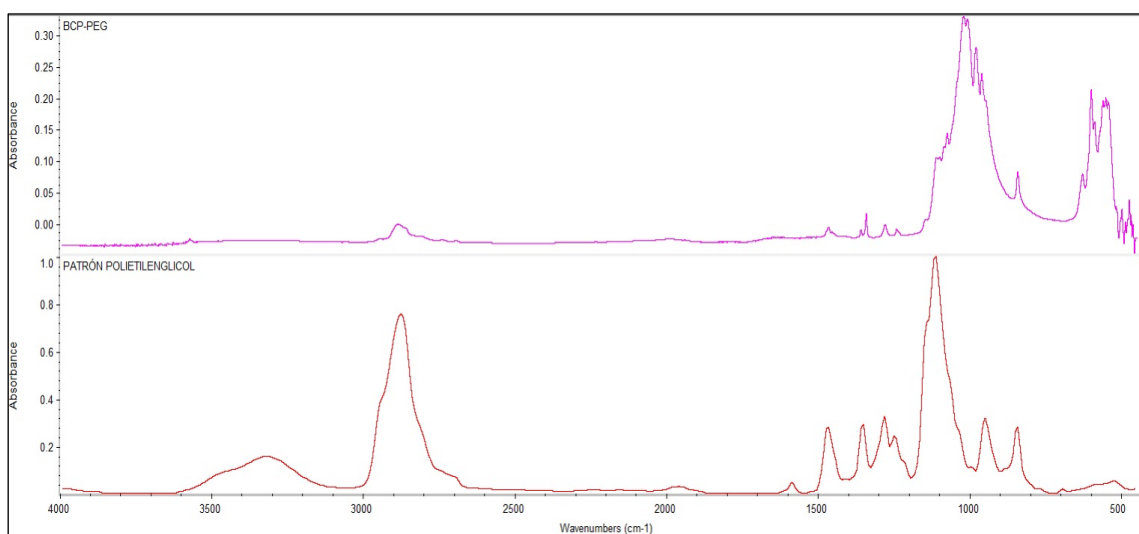


Figura 39 Espectro de IR del BCP recubierto con PEG y patrón de PEG, respectivamente

En la Figura 40 se muestran imágenes BCP funcionalizado con PEG. Como se puede observar en las imágenes se ha confirmado que el polímero recubre totalmente a las partículas de BCP o aglomeraciones de partículas de BCP. Indicar que el recubriendo es casi completo observando muy pocas partículas de BCP sin recubrir con PEG

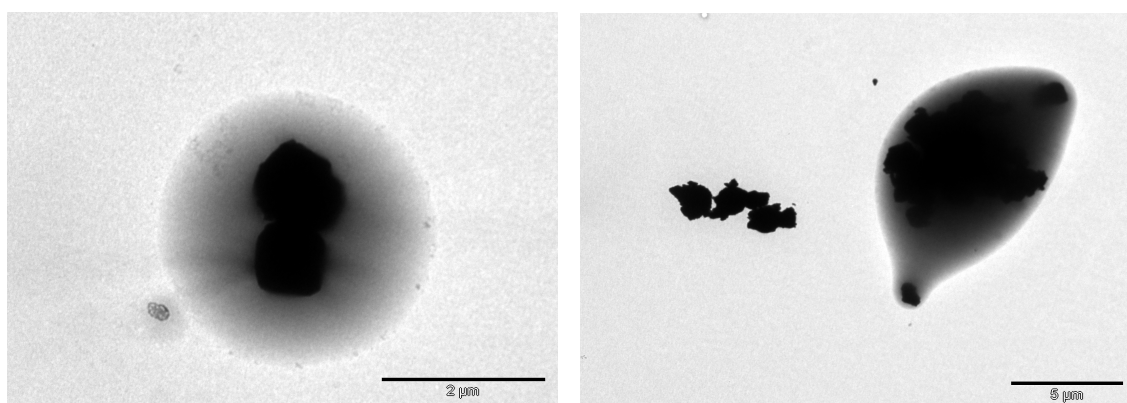


Figura 40 Micrografías TEM de BCP recubierto de PEG 3000

#### 6.4 ESTUDIO DE PROPIEDADES MECÁNICAS DEL BCP

Una vez confirmado que el BCP presenta la composición química y las estructuras cristalinas deseadas y que es un material poroso, para que este material sea adecuado para la preparación de *scaffolds* es necesario que sus propiedades mecánicas sean adecuadas para esta aplicación. Para ello, se prepararon las probetas de BCP siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 5.4 y se realizaron los ensayos de compresión.

El ensayo de compresión consta de tres etapas diferenciadas:

- Las probetas se sitúan en el centro de las placas que van a realizar la fuerza para comprimirlas y se aproximan hasta que la superficie de la probeta toca con la placa superior de la máquina universal de ensayos.
- Una vez situada la placa se ajustan todos los parámetros a cero (tanto fuerza como desplazamiento) y se inicia el ensayo de compresión.
- Alcanzado el 50% del valor de la altura de la probeta en el desplazamiento de la placa, se detiene el ensayo y se retira la probeta.

A continuación se muestran las imágenes de las tres etapas del ensayo de compresión.

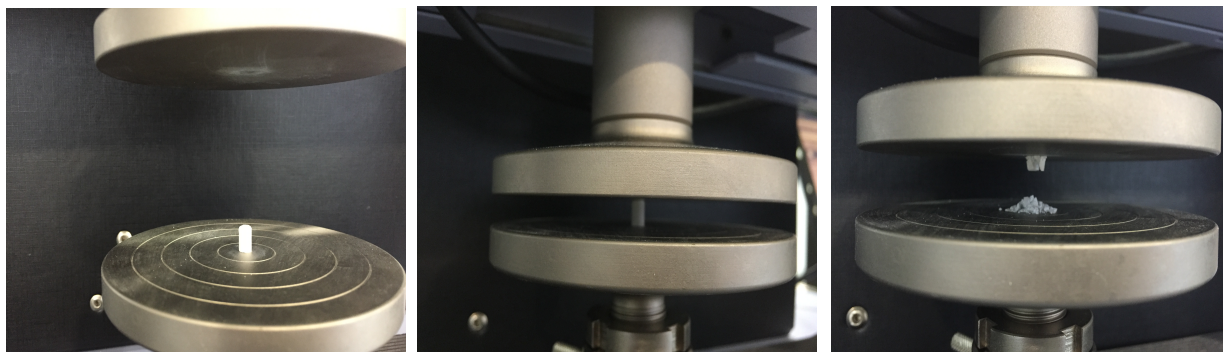


Figura 41 Etapas del ensayo de compresión

De los ensayos se registraron curvas de fuerza aplicada frente al desplazamiento, véase Figura 42. Como se puede observar el comportamiento es similar en las tres probetas estudiadas. En todas ellas, se observa inicialmente un aumento casi lineal de la fuerza frente al desplazamiento, esta es la zona de comportamiento elástico del material en la cual al aumentar la fuerza se observa un máximo en la curva, correspondiendo ese máximo con la fractura de la probeta. La fractura inicial del material tiene lugar en la región elástica y el material presenta un pequeño

desplazamiento en el momento de la fractura (meseta) el cual corresponde a la fractura frágil, como es habitual en las cerámicas.

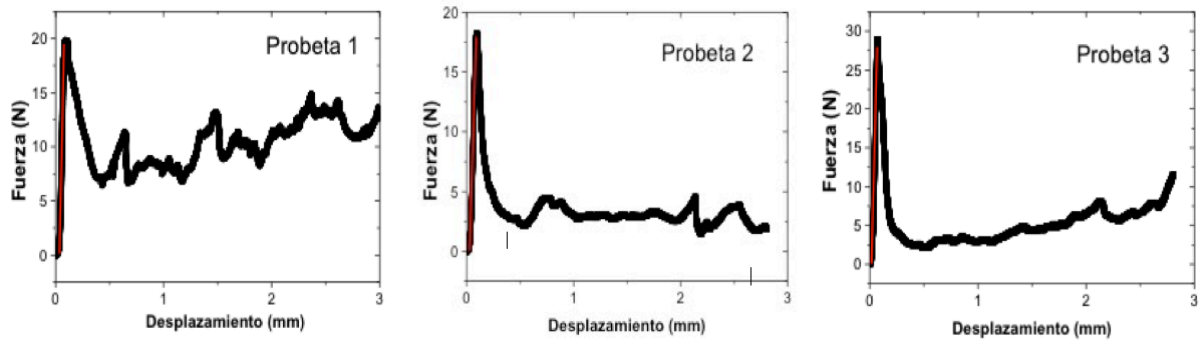


Figura 42 Gráficas fuerza-desplazamiento de los ensayos de compresión de cada probeta

Hay que destacar que superado el máximo si seguimos aplicándole fuerza el material continúa ofreciendo resistencia. Esto es debido a la porosidad del material, ya que a medida que se va aplastando, se rompen las paredes de los poros y por tanto se compacta el material, lo que le hace aguantar más presión de la esperada inicialmente. Este comportamiento no ocurre una vez, sino que a medida que se va compactando más y más las paredes de los poros del material se van rompiendo y compactando sucesivamente, de ahí que se observen varios picos en la curva y se observa un ligero aumento de la curva, la conocida como zona de compactación.

A partir de las curvas de fuerza-desplazamiento, se han obtenido los siguientes valores de módulo de Young, resistencia a la compresión y desplazamiento a la fractura que se recogen en la Tabla 5

Tabla 5 Propiedades mecánicas del BCP extraídas del ensayo de compresión

Altura de la probeta (mm)	Módulo de Young (MPa)	Resistencia a la compresión (MPa)	Desplazamiento en fractura (mm)
(1) 6.6	68.5	1.425	0.1079
(2) 7.0	73.9	1.317	0.0959
(3) 5.6	93.0	2.089	0.0736

Como se puede observar, los valores del módulo de Young son bastante similares entre ellos y la resistencia a la compresión está en torno a 1.5-2 MPa, valor que concuerda con el encontrado en la bibliografía (aproximadamente 2 MPa<sup>45</sup>). El desplazamiento de la máquina de ensayo universal justo en el momento de la fractura

es aproximadamente del 1.5% del valor de la altura de las probetas, por lo que podemos concluir que el material es muy frágil.

Por tanto, el BCP preparado mediante vía húmeda presenta el comportamiento mecánico esperado para este tipo de material, con la peculiaridad de que este muy poroso, lo cual lo hace adecuado para se pueda emplear como andamiaje en tejido óseo.



## 7 CONCLUSIONES – CONCLUSIÓNS- CONCLUSIONS

---

### 7.1 CONCLUSIONES

---

En relación a los resultados obtenidos, se resumen a continuación las conclusiones de este Trabajo de Fin de Grado:

- Se ha conseguido preparar BCP mediante una síntesis relativamente rápida y sencilla empleando un método de vía húmeda. La caracterización del material obtenido mediante diferentes técnicas tales como difracción de rayos X, espectroscopia de IR, TGA, SEM-EDX ha confirmado que el BCP obtenido presenta la composición química y las estructuras cristalinas deseadas y que es un material poroso. También se ha realizado un estudio de las propiedades mecánicas del BCP, obteniendo un módulo de Young y resistencia a la compresión similares a los descritos en la bibliografía para este tipo de material. Por lo tanto, el BCP preparado presenta la composición, porosidad y resistencia mecánica adecuadas para ser empleado como *scaffold* en la regeneración de tejido óseo.
- Se ha conseguido preparar hidroxiapatita y  $\beta$ -fosfato tricálcico puros mediante un método cerámico. A diferencia del BCP, no se ha conseguido preparar estos materiales puros mediante el método de vía húmeda. También se ha comprobado que el método de síntesis tiene una gran influencia en el tamaño de partícula del material, así, el BCP formado mediante el método de vía húmeda presenta un tamaño de partícula muy inferior al de la HA y del  $\beta$ -TCP formado mediante el método cerámico.
- El recubrimiento del BCP con policaprolactona o polietilenglicol se ha estudiado mediante FTIR-ATR y TEM, observando que en el caso del recubrimiento con PCL se ha conseguido preparar el polímero pero este no se ha adherido a las partículas del BCP. En cambio, en el recubrimiento con PEG, sí que se ha recubierto la superficie de la cerámica, formándose esferas de PEG en las que en su interior había partículas de BCP o aglomerados de BCP. Por lo tanto, este material puede ser empleado en la preparación de biocomposites para la regeneración de tejido óseo.

## 7.2 CONCLUSIÓNS

---

En relación aos resultados obtidos, resúmense a continuación as conclusións deste Traballo de Fin de Grao:

- Conseguiuse preparar BCP mediante unha síntese relativamente rápida e sinxela empregando un método de vía húmida. A caracterización do material obtido realizouse mediante diferentes técnicas tales como a difracción de raios X, espectroscopía de IR, TGA, SEM-EDX, confirmou que o BCP obtido presenta a composición química e as estruturas cristalinas desexadas e que é un material poroso. Tamén se realizou un estudio das propiedades mecánicas do BCP, obtendo un módulo de Young e resistencia á compresión similares aos descritos na bibliografía para este tipo de material. Polo tanto, o BCP preparado presenta composición, porosidade e resistencia mecánica axeitadas para ser empregado como *scaffold* na rexeneración de tecido óseo.
- Conseguiuse preparar hidroxapatita e  $\beta$ -fosfato tricálcico puros mediante un método cerámico. A diferenza do BCP, non se puideron preparar estes materiais puros mediante o método de vía húmida. Tamén se comprobou que o método de síntese ten una gran influencia no tamaño de partícula do material, así, o BCP formado mediante o método de vía húmida presenta un tamaño de partícula moi inferior á HA e ao  $\beta$ -TCP formado mediante o método cerámico.
- O recubrimento do BCP con policaprolactona ou polietilenglicol estudouse mediante FTIR-ATR e TEM, observando que no caso do recubrimento con PCL conseguíuse preparar o polímero pero non se adheriu ás partículas do BCP. Por outra banda, no recubrimento con PEG, si que se recubriu a superficie da cerámica, formándose esferas de PEG nas que no seu interior había partículas de BCP ou aglomerados de BCP. Polo tanto este material pode ser empregado na preparación de biocomposites para a rexeneración de tecido óseo.



### 7.3 CONCLUSIONS

---

In relation to the results obtained, the conclusions of this Final Grade Project are summarized below:

- BCP was successfully synthesized by a relatively quick and simple wet-method. The obtained material was characterized by different techniques, such as X-ray diffraction, IR spectroscopy, TGA, SEM-EDX, and confirms that the obtained BCP shows the adequate chemical composition and the crystalline structures and it is a porous material. Also, it was carry out a study of BCP's mechanic properties, obtaining a Young's modulus and a compressive strength values similar to the literature. Therefore, the obtained BCP shows composition, porosity and mechanical strength appropriate to be used as a scaffold in bone tissue regeneration.
- Single phase HA and  $\beta$ -TCP were successfully synthesized by a dry-method. In contrast with the BCP, these materials could not be prepared as single phase by a wet-method. It was also found that the synthesis method has a great influence on the particle size of the materials. In this case, the obtained BCP, by a wet-method synthesis, shows smaller particle size than HA and  $\beta$ -TCP synthesized by a dry-method.
- The PCL or PEG coating of the BCP has been studied by FTIR-ATR and TEM, obtaining that the PCL polymer was synthesized but it does not grafted on the surface of BCP particles. However, in the case of de PEG coating, it has coated the ceramic's surface, forming spheres of PEG in which inside are BCP particles or agglomerate. So, this material could be used in the preparation of biocomposites for bone tissue regeneration.



## 8 BIBLIOGRAFÍA

---

- (1) Bhat, S. V. *Biomaterials*; Kluwer Academic Publishers and Narosa Publishing House, 2002.
- (2) Agrawal, C. M.; Ong, J. L.; Appleford, M. R.; Mani, G. *Introduction to Biomaterials*; Cambridge University Press, 2014.
- (3) Ratner, B. D.; Hoffman, A. S.; Schoen, F. J.; Lemons, J. E. *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*; Elsevier, 2013.
- (4) Calafat, M. E. *Real Academia de Ciencias* **2000**, 10, 113.
- (5) Mondal, D.; Griffith, M.; Venkatraman, S. S. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials* **2016**, 65, 254.
- (6) Imagen de lentilla <https://myprofeciencias.wordpress.com/2010/10/26/los-biomateriales/> (accessed may 3, 2016).
- (7) Dorozhkin, S. V. *Acta Biomaterialia* **2012**, 8, 963.
- (8) Legeros, R. Z.; Lin, S.; Rohanizadeh, R.; Mijares, D.; Legeros, J. P. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **2003**, 14, 201.
- (9) Sánchez-Salcedo, S.; Arcos, D.; Vallet-Regí, M. *Key Engineering Materials* **2008**, 377, 19.
- (10) Kokubo, T. *Bioceramics and their clinical applications*; CRC Press, 2015; Vol. 1.
- (11) Dorozhkin, S. V. *Calcium Orthophosphates*; Pan Stanford, 2012.
- (12) Elliott, J. C. *Structure and Chemistry of the Apatites and Other Calcium Orthophosphates*; Elsevier, 1994.
- (13) Imaizumi, H.; Sakurai, M.; Kashimoto, O.; Kikawa, T.; Suzuki, O. *Calcified Tissue International* **2006**, 78, 45.
- (14) Materials, Universitat de Barcelona <http://www.ub.edu/cmematerials/es/content/hidroxiapatita> (accessed abr 28, 2016).
- (15) Kannan, S.; Goetz-Neunhoeffler, F.; Neubauer, J.; Ferreira, J. M. F. *Journal of the American Ceramic Society* **2008**, 91, 1.
- (16) Al-Sanabani, J. S.; Madfa, A. A.; Al-Sanabani, F. A. *International Journal of Biomaterials* **2013**, 1, 876132.
- (17) Callister, W. D. J. *Introducción a la Ciencia e Ingeniería de los Materiales*; Editorial Reverté S.A., 1995.

- (18) Shackelford, J. F. *Introducción a la ciencia de materiales para ingenieros*; Pearson, 2005.
- (19) Villora, J. M.; Callejas, P.; Barba, M. F. *Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio* **2002**, 450, 443.
- (20) Miranda, P.; Saiz, E.; Gryn, K.; Tomsia, A. P. *Acta Biomaterialia* **2006**, 2, 457.
- (21) Yashima, M.; Sakai, A.; Kamiyama, T. *Journal of Solid State Chemistry* **2003**, 175, 272.
- (22) Dorozhkina, E. I.; Dorozhkin, S. V. *Chemistry of Materials* **2002**, 14, 4267.
- (23) Zyman, Z.; Ivanov, I.; Glushko, V.; Dedukh, N.; Malyshkina, S. *Biomaterials* **1998**, 19, 1269.
- (24) Ramakrishna, S.; Huang, Z.-M.; Kumar, G. V.; Batchelor, A. W.; Mayer, J. *An Introduction to Biocomposites*; Imperial College Press, 2004; Vol. 1.
- (25) Imagen de Neogel <http://www.teknimed.com/products-portfolio/products/spine/bone-substitutes/neogel-str/> (accessed may 22, 2016).
- (26) Gyawali, D.; Nair, P.; Kim, H. K. W.; Yang, J. *Biomaterials Science* **2013**, 1, 52.
- (27) Estrada, C.; Paz, A. C.; López, L. E. *Revista EIA* **2006**, 5, 93.
- (28) Página web de la Federal Drugs Administration (FDA) <http://www.fda.gov/AboutFDA/Transparency/Basics/EnEspanol/ucm196467.htm> (accessed may 3, 2016).
- (29) Página web de la European Medicines Agency (EMA) [http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/about\\_us/general/general\\_content\\_000091.jsp](http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/about_us/general/general_content_000091.jsp) (accessed may 7, 2016).
- (30) *CARBOWAX™ SENTRY™ Polyethylene Glycols Compliance Innovation*; The Dow Chemical Company, 2011.
- (31) Niaounakis, M. *Biopolymers: Processing and Products*; Elsevier, 2015.
- (32) Williams, J. M.; Adewunmi, A.; Schek, R. M.; Flanagan, C. L.; Krebsbach, P. H.; Feinberg, S. E.; Hollister, S. J.; Das, S. **2005**, 26, 4817.
- (33) Chemindustry <http://chemindustry.ru/eng/chemicals/chemicals.php> (accessed may 25, 2016).
- (34) Wang, Y.; Dai, J.; Zhang, Q.; Xiao, Y.; Lang, M. *Applied Surface Science* **2010**, 256, 6107.
- (35) Smart, L. E.; Moore, E. A. *Solid State Chemistry, an introduction*; CRC Press, 2012.

- (36) International Centre for Diffraction Data <http://www.icdd.com> (accessed jun 3, 2016).
- (37) Programa Match! <http://www.crystalimpact.com/> (accessed abr 28, 2016).
- (38) Página web de los Servicios de Apoyo a la Investigación de la UDC <https://www.sai.udc.es> (accessed abr 30, 2016).
- (39) Base de datos empleada para la caracterización de los espectros de IR de absorbanza <http://webbook.nist.gov/chemistry/> (accessed may 7, 2016).
- (40) Programa OMNIC Specta <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/D22224~.pdf> (accessed may 31, 2016).
- (41) Alpert, N. L.; Keiser, W. E.; Szymanski, H. A. *Theory and Practice of Infrared Spectroscopy*; Plenum Press, 1964.
- (42) Laudate, T. *Advanced Materials and Processes* **2008**, 1, 45.
- (43) Página web de Netzsch Thermal Analysis <https://www.netzsch-thermal-analysis.com/us/products-solutions/simultaneous-thermogravimetry-differential-scanning-calorimetry/> (accessed may 7, 2016).
- (44) Jastrzbski, W.; Sitarz, M.; Rokita, M.; Bulat, K. *Spectrochimica Acta Part A* **2011**, 79, 722.
- (45) Kim, M.; Kim, Y.-H.; Park, I.-H.; Min, Y.-K.; Seo, H.-S.; Lee, B.-T. *Korean Journal of Materials Research* **2010**, 20, 331.
- (46) Imagen del SEM <http://www.labcompare.com/1346-Scanning-Electron-Microscopes-SEM/9180430-NeoScope-JCM-6000-Benchttop-Scanning-Electron-Microscope/> (accessed may 8, 2016).
- (47) Página web de Shimadzu <http://www.ssi.shimadzu.com/products/product.cfm?product=ags-x> (accessed jun 3, 2016).